

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE VETERINARIA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGÍA ANIMAL I (SANIDAD ANIMAL)

**EFFECTO DE LA INFECCIÓN POR EL VIRUS DEL
SÍNDROME REPRODUCTOR Y RESPIRATORIO PORCINO
(VSRRP) EN EL VERRACO Y EN LA CERDA AL
COMIENZO DE LA GESTACIÓN: SUS REPERCUSIONES
EN LA REPRODUCCIÓN**

TESIS DOCTORAL

CINTA PRIETO SUÁREZ
Madrid, 1997

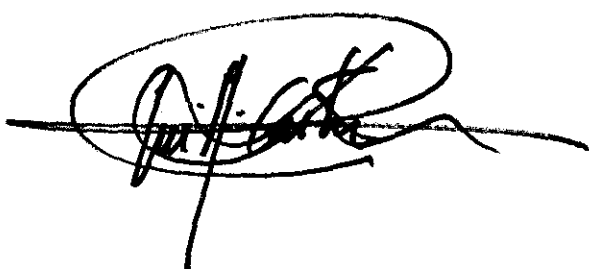
**Memoria presentada por Cinta Prieto Suárez para optar al grado de Doctor en Veterinaria.
Madrid, 1997**

D. José M^a Castro Arganda, Profesor Titular del Departamento de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid (UCM) y D. Alfredo Solana Alonso, Catedrático del mismo Departamento,

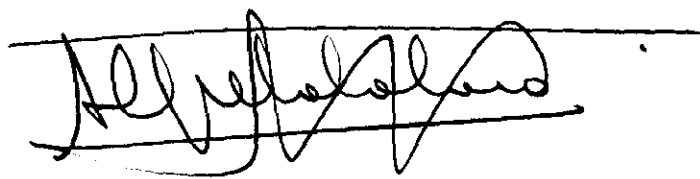
CERTIFICAN:

que la tesis doctoral titulada: "Efecto de la infección por el virus del síndrome respiratorio y reproductor porcino (VSRRP) en el verraco y en la cerda al comienzo de la gestación: sus repercusiones en la reproducción", de la que es autora la licenciada en Veterinaria por la UCM D^a Cinta Prieto Suárez, ha sido realizada en las dependencias del Dpto. de Patología Animal I (Sanidad Animal) de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid bajo nuestra dirección y cumple todas las condiciones exigidas para optar al grado de doctor en Veterinaria.

De acuerdo con la normativa vigente, firmamos el presente certificado, autorizando su presentación como directores de la mencionada tesis doctoral en Madrid a veintinueve de mayo de mil novecientos noventa y siete.

A handwritten signature in black ink, enclosed within a large, hand-drawn oval. The signature is stylized and appears to be 'J. Castro Arganda'.

Fdo.: José M^a Castro Arganda

A handwritten signature in black ink, consisting of several fluid, connected loops and strokes. It appears to be 'Alfredo Solana Alonso'.

Fdo.: Alfredo Solana Alonso

ÍNDICE

I. INTRODUCCIÓN	1
1.1. Definición e historia de la enfermedad	2
1.2. Etiología	4
1.2.1. Identificación del agente causal	4
1.2.2. Clasificación taxonómica	5
1.2.3. Variabilidad	6
1.2.4. Características morfológicas y físico-químicas del virus	8
1.2.5. Genoma y proteínas víricas	8
1.2.6. Replicación del virus	11
1.2.7. Crecimiento en cultivos celulares	12
1.2.8. Capacidad de supervivencia	13
1.3. Epizootiología	14
1.3.1. Incidencia y prevalencia	14
1.3.2. Persistencia de la infección	17
1.3.3. Mecanismos de transmisión	20
1.3.4. Factores de riesgo	22
1.4. Importancia económica	23
1.5. Patogenia	24
1.5.1. Distribución orgánica del virus	24
1.5.2. Efecto del VSRRP en los verracos	30
1.5.3. Efecto del VSRRP en las cerdas	35
1.6. Sintomatología	44
1.7. Lesiones	48
1.7.1. Lesiones macroscópicas	48
1.7.2. Lesiones microscópicas	49
1.8. Respuesta inmunológica	51
1.9. Diagnóstico	55
1.9.1. Diagnóstico clínico	55
1.9.2. Diagnóstico anátomo- patológico	56
1.9.3. Diagnóstico serológico	57
1.9.4. Determinación del VSRRP	60
1.9.4.1. Aislamiento vírico	60
1.9.4.2. Detección vírica	62
1.10. Tratamiento	63
1.11. Prevención y control	65

1.11.1. Profilaxis higio-sanitaria	65
1.11.2. Profilaxis médica	71
II. OBJETIVOS	80
III. MATERIALES Y MÉTODOS	87
3.1. Cultivos celulares y virus utilizados	88
3.1.1. Producción de los lotes de virus utilizados	89
3.1.2. Titulación del virus	89
3.1.3. Aislamiento del virus en las muestras clínicas	89
3.2. Detección del VSRRP mediante el empleo de la técnica de RT-PCR	90
3.3. Detección de anticuerpos frente al VSRRP mediante la técnica de IPMA	92
3.4. Detección de anticuerpos frente al VSRRP mediante la técnica de ELISA	94
3.5. Diseño experimental para llevar a cabo los objetivos A.1, A.2 y A.3.	94
3.5.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos	94
3.5.2. Inoculación experimental y toma de muestras	94
3.5.3. Recogida de semen y valoración de la calidad espermática	95
3.5.4. Determinación del VSRRP en las muestras obtenidas	97
3.5.4.1. Preparación de las muestras	97
3.5.4.2. Métodos de detección de anticuerpos utilizados	98
3.5.4.3. Métodos de detección vírica empleados	98
3.5.5. Análisis estadísticos	99
3.6. Diseño experimental para llevar a cabo los objetivos A.1., A.4. y A.5.	99
3.6.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos	99
3.6.2. Inoculación experimental de los animales con el VSRRP y sacrificio de los mismos	100
3.6.3. Toma de muestras	100
3.6.4. Determinación del VSRRP en las muestras obtenidas	102
3.6.4.1. Preparación de las muestras	102
3.6.4.2. Métodos empleados para la determinación de anticuerpos	103
3.6.4.3. Métodos de determinación vírica empleados	103
3.6.4.3.1. Aislamiento vírico	103
3.6.4.3.2. Prueba biológica	103
3.7. Diseño experimental para llevar a cabo los objetivos A.6 y A.7.	104
3.7.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos	104
3.7.2. Sincronización de celos e inseminación artificial	104
3.7.3. Tratamientos empleados e inoculación experimental	105
3.7.4. Toma de muestras	106
3.7.5. Determinación del VSRRP en las muestras obtenidas	107

3.7.5.1. Preparación de las muestras	107
3.7.5.2. Métodos de detección de anticuerpos empleados	107
3.7.5.3. Métodos de detección vírica utilizados	108
3.7.6. Análisis estadísticos	108
3.8. Diseño experimental para llevar a cabo los objetivos B.1, B.2, B.3 y B.4.	108
3.8.1. Exposición al VSRRP en el día 0 de gestación	108
3.8.1.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos	108
3.8.1.2. Sincronización de celos e inseminación artificial	109
3.8.1.3. Tratamientos empleados e inoculación experimental	109
3.8.1.4. Toma de muestras	110
3.8.1.5. Determinación del VSRRP en las muestras obtenidas	112
3.8.1.5.1. Procesamiento de las muestras	112
3.8.1.5.2. Métodos de detección de anticuerpos empleados	113
3.8.1.5.3. Métodos de detección vírica empleados	113
3.8.1.6. Análisis estadísticos	113
3.8.2. Exposición al VSRRP en los días 7, 14 y 21 de gestación	113
3.8.2.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos	113
3.8.2.2. Sincronización de celos e inseminación artificial	114
3.8.2.3. Inoculación experimental	115
3.8.2.4. Toma de muestras	116
3.8.2.5. Detección del VSRRP en las muestras obtenidas	117
3.8.2.5.1. Procesamiento de las muestras	117
3.8.2.5.2. Métodos de detección de anticuerpos utilizados	117
3.8.2.5.3. Métodos de detección vírica empleados	118
3.9. Diseño experimental para llevar a cabo el objetivo B.5	118
3.9.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos	118
3.9.2. Virus utilizado	118
3.9.3. Sincronización de celos e inseminación artificial	119
3.9.4. Recolección de los embriones	119
3.9.5. Exposición de los embriones al VSRRP	121
3.9.6. Estudio del efecto del VSRRP sobre el desarrollo embrionario	122
3.9.7. Determinación del VSRRP en los embriones	123
3.9.7.1. Preparación de los embriones	123
3.9.7.2. Técnicas de detección vírica empleadas	123
IV. RESULTADOS	125
4.1. Estudio de la infección por el VSRRP en el verraco: sintomatología asociada a la misma, efecto sobre la calidad espermática y eliminación del virus por la vía	

seminal (objetivos A.1, A.2 y A.3)	126
4.1.1. Signos clínicos observados	126
4.1.2. Efecto de la inoculación con el VSRRP sobre la calidad espermática	135
4.1.3. Serología	148
4.1.4. Detección del virus	148
4.2. Estudio de la infección por el VSRRP en los verracos: sintomatología asociada a la misma, estudio de la distribución orgánica del virus y de su eliminación y determinación de la procedencia del virus que se elimina por la vía genital (objetivos A.1, A.4 y A.5)	150
4.2.1. Signos clínicos observados	150
4.2.2. Serología	150
4.2.3. Distribución del VSRRP en el aparato reproductor	153
4.2.4. Distribución del VSRRP en los distintos órganos, exceptuando el aparato reproductor, tras la inoculación experimental	155
4.2.5. Estudio de eliminación del VSRRP por las distintas vías	155
4.3. Estudio de la infección por el VSRRP en los verracos: transmisión venerea de la enfermedad y efecto de la presencia del VSRRP en el semen sobre la eficacia reproductiva (objetivos A.6 y A.7)	159
4.3.1. Sintomatología clínica	159
4.3.2. Serología	161
4.3.3. Efecto de la exposición al VSRRP por la vía intrauterina sobre la reproducción	163
4.3.4. Detección del VSRRP en las distintas muestras recogidas	165
4.4. Estudio del efecto de la exposición de cerdas nulíparas al VSRRP en el día 0 de gestación: sintomatología asociada a la infección, efecto sobre las tasas de concepción y fertilización, efecto sobre el desarrollo embrionario y susceptibilidad de los embriones a la infección por el virus (objetivos B.1, B.2, B.3 y B.4)	169
4.4.1. Signos clínicos observados	169
4.4.2. Serología	171
4.4.3. Efecto de la exposición al VSRRP por las vías intranasal e intravenosa en el momento de la cubrición sobre la reproducción	173
4.4.4. Detección del VSRRP en las distintas muestras recogidas de los animales en estudio	178
4.5. Estudio del efecto de la exposición de cerdas al VSRRP en los días 7, 14 ó 21 de gestación: sintomatología asociada a la infección, efecto sobre el desarrollo embrionario y susceptibilidad de los embriones a la infección por el virus	

(objetivos B.1, B.3 y B.4)	181
4.5.1. Signos clínicos	181
4.5.2. Serología	181
4.5.3. Efecto de la exposición al VSRRP por la vía intranasal en los días 7,14 ó 21 de gestación sobre la reproducción	186
4.5.4. Detección del VSRRP en las distintas muestras recogidas a lo largo del estudio	189
4.6. Estudio <i>in vitro</i> del efecto que el VSRRP tiene sobre los embriones en el estadio de entre 4 y 16 células: papel protector de la <i>zona pellucida</i> , susceptibilidad de los embriones a la infección por el virus, efecto del VSRRP sobre el desarrollo (objetivo B.5)	191
4.6.1. Desarrollo de los embriones <i>in vitro</i>	191
4.6.2. Detección del VSRRP en los embriones tras 72 horas de cultivo <i>in vitro</i>	192
V. DISCUSIÓN	193
5.1. Objetivo A: efecto de la infección por el VSRRP en el verraco	194
5.2. Objetivo B: efecto que la infección por el VSRRP tiene en las cerdas en el primer tercio de la gestación	207
VI. CONCLUSIONES	219
VII. BIBLIOGRAFÍA	222

I. INTRODUCCIÓN

1.1. DEFINICIÓN E HISTORIA DE LA ENFERMEDAD

El síndrome reproductor y respiratorio porcino (SRRP) es una enfermedad de reciente aparición que afecta a la especie porcina y se caracteriza por inducir un fallo reproductivo en las cerdas y por producir una sintomatología respiratoria en los cerdos de todas las edades. Fue descrita por primera vez en Carolina del Norte, Minnesota y Iowa, en Los Estados Unidos de América del Norte (EE.UU.) en los años 1987 y 1988 (Dial y Parsons, 1989; Keffaber, 1989; Hill, 1990), aunque estudios serológicos retrospectivos realizados utilizando serotecas obtenidas para el control de la enfermedad de Aujeszky han puesto de manifiesto la presencia de animales seropositivos a partir de 1985 (Hill *et al.*, 1992). Dado que en ese momento no se conocía cuál era la etiología de la enfermedad, ésta fue denominada enfermedad misteriosa del cerdo (Dial *et al.*, 1990). Un síndrome similar fue descrito en Canadá en el otoño de 1987 (Morin y Robinson, 1991; Dea *et al.*, 1992a), siendo aislado el agente causal poco tiempo después (Dea *et al.*, 1992a,b y c). Sin embargo, estudios retrospectivos han revelado la presencia de sueros positivos a partir de 1979 en la provincia de Ontario (Carman *et al.*, 1995). En los años 88 y 89 alcanzó un pico de incidencia en EE.UU. (Stevenson *et al.*, 1993) y en el año 1990 la enfermedad ya se había detectado en 11 estados de EE.UU. y dos provincias de Canadá (Ontario y Québec) (Hill, 1990; Sanford, 1992; Voicu *et al.*, 1992).

En Europa se detectó un síndrome similar a la enfermedad misteriosa en noviembre de 1990 en Münster (Alemania) (Lindhaus y Lindhaus, 1991), aunque, al igual que ha sucedido en EE.UU., se han detectado, en estudios retrospectivos, granjas seropositivas a partir del año 1988 (Ohlinger, 1992a). Desde su descripción en Alemania, se ha difundido rápidamente por todos los países europeos. Así, en enero de 1991, se reconoció oficialmente que había alcanzado Holanda, aparentemente por difusión aerógena, aunque los primeros síntomas de la enfermedad ya habían aparecido en algunas granjas holandesas en diciembre de 1990. En España se detectaron los primeros casos en enero de 1991 en un lote de 300 lechones importados de Alemania que mostraron alteraciones respiratorias (Plana *et al.*, 1992b). Poco después, en dos explotaciones de ciclo cerrado situadas cerca de donde habían aparecido los problemas respiratorios, se identificó una enfermedad caracterizada por un aumento en el número de abortos durante la última fase de la gestación y en la mortalidad durante la lactación la cual alcanzó un 70%. Aunque la etiología no fue determinada, su sintomatología era similar a la de la nueva enfermedad reconocida pocos meses antes en Alemania. Desde esta zona, a pesar de que se ordenó el sacrificio obligatorio de todos los animales en las granjas afectadas, se ha extendido por todo el país. También a Dinamarca llegó la enfermedad procedente, aparentemente, de Alemania, aunque esta vez por difusión aerógena, siendo descrita en enero de 1992. En marzo de 1991 se confirmó su presencia en Bélgica y en abril de ese mismo año, en un seminario sobre la enfermedad llevado a cabo en Bruselas por la Unión

Introducción

Europea, se afirmó que había 3000 granjas afectadas en Alemania, 1400 en Holanda, 30 en Bélgica y 2 en España, a la vez que se describió un descenso de los casos que se presentaban en los lugares donde primero había aparecido. En el mes de mayo de ese mismo año se detectó en el Reino Unido, en primer lugar en South Humberside, desde donde se extendió a otras regiones a pesar de las medidas restrictivas tomadas por el gobierno de acuerdo con la Unión Europea. En octubre aparecieron los primeros síntomas en Francia, siendo confirmada la presencia de la enfermedad en Bretaña en noviembre por el aislamiento del agente causal y por pruebas serológicas (Albina *et al.*, 1992; Baron *et al.*, 1992). A pesar de que la comisión de la Unión Europea hizo obligatoria su notificación e impuso limitaciones al movimiento de animales procedentes de granjas infectadas en marzo de 1991, la enfermedad se ha extendido por toda Europa en un breve periodo de tiempo, levantándose por ello las medidas de control a finales de 1992, momento en que la Unión Europea estimó que era enzoótica en Alemania, Holanda, Bélgica, España, El Reino Unido, Francia y Dinamarca. En noviembre de ese mismo año apareció en Suiza y un año después en Austria. En Italia y Polonia se ha confirmado su presencia serológicamente, produciéndose el primer brote en Italia en octubre de 1992, momento en que también apareció en Luxemburgo. Sin embargo, y a pesar de su amplia y rápida difusión, la importancia de la enfermedad parece haber disminuido desde los primeros brotes, posiblemente debido al desarrollo de una inmunidad frente a la misma después de la primera epizootia.

Su presentación no se ha limitado a Norte América y Europa, y así, en febrero de 1992 aparecieron indicios clínicos de la enfermedad en Malta. De la misma manera han aparecido indicios de la misma en Chile, que no han sido confirmados serológicamente, y en otros países de Sudamérica, como Brasil y México, aunque no se ha notificado oficialmente su presencia. En 1992 se descubrió en Japón (Kuwahara *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1994), aislándose posteriormente el agente causal (Murakami, *et al.*, 1994; Shimizu *et al.*, 1994). Este mismo año se identificó en Filipinas y en la República de Corea (Kang *et al.*, 1994).

A pesar del gran número de países afectados, la verdadera extensión de la enfermedad parece ser mayor de la que oficialmente se ha reconocido, ya que, por un lado, los países que han notificado la enfermedad han sufrido pérdidas económicas debido a las limitaciones al comercio internacional que en un principio fueron impuestas y, por otro lado, la presentación clínica ha cambiado en los últimos años, dando lugar a la existencia de granjas seropositivas en las que nunca se ha reconocido la sintomatología característica de la enfermedad. En la actualidad se encuentra en la lista B de las enfermedades contagiosas de la Oficina Internacional de Epizootias y, por tanto, no es obligatoria su declaración.

Debido a su amplia y rápida difusión por todo el mundo, la enfermedad ha recibido

distintas denominaciones en los diferentes países donde se ha descrito. La primera de ellas (enfermedad misteriosa del cerdo) se acordó en 1990 en Denver (EE.UU.), en un seminario organizado por el Instituto para la Conservación del Ganado. Sin embargo, cuando apareció en Europa se le dio la denominación de aborto azul en Holanda, enfermedad de las orejas azules en El Reino Unido y síndrome disgénico y respiratorio del cerdo en Francia. Posteriormente en EE.UU. y Canadá se ha utilizado el nombre de SIRS (sigla de las palabras “swine infertility and respiratory syndrome”) (Collins *et al.*, 1991) y en Europa de PEARS (sigla de las palabras “porcine epidemic abortion and respiratory syndrome”) (Terpstra *et al.*, 1991). La Unión Europea acordó en 1991 denominar a la enfermedad PRRS (sigla de las palabras “porcine reproductive and respiratory syndrome”). Posteriormente, la Oficina Internacional de Epizootias ha decidido adoptar esta última denominación, la cual también ha sido adoptada en el Simposium Internacional sobre la enfermedad llevado a cabo en St. Paul (Minnesota) en 1992. En España se ha traducido la denominación adoptada por la Unión Europea y se denomina a la enfermedad SRRP.

1.2. ETIOLOGÍA

1.2.1. Identificación del agente causal

Varios agentes etiológicos fueron considerados posible causa del SRRP, incluyendo una variante antigénica de un virus influenza tipo A, el virus de la encefalomiocarditis, el virus de la enfermedad de Aujeszky, el parvovirus porcino, el virus de la influenza porcina, el virus de la encefalomielitis, el virus de la peste porcina, enterovirus porcinos, citomegalovirus porcinos, paramixovirus, *Chlamidia psittaci*, *Leptospira interrogans* serovariantes *pomona* y *bratislava*, además de micotoxinas y deficiencias de vitamina E y de selenio (Joo, 1988; Keffaber, 1989; Bilodeau *et al.*, 1991; Bane *et al.*, 1992; Brun *et al.*, 1992; Carlton, 1992). De todos estos agentes los que más peso tuvieron fueron el virus de la encefalomiocarditis y el virus influenza tipo A. El primero fue propuesto como posible causa de la enfermedad ya que algunos fetos afectados presentaban una tasa de anticuerpos mayor de 1/16 frente a este virus y, en algunos casos, se podía aislar de los mismos, además de aislarse de algunos animales con sintomatología respiratoria. En segundo lugar, en ocasiones, se observaban lesiones de miocarditis y encefalitis. Por último, con este virus se podían reproducir las infecciones trasplacentarias y la muerte de los fetos tras la inoculación experimental. Sin embargo, se observó que no todas las cerdas afectadas seroconvertían a este virus y que el aislamiento y la detección del mismo por inmunofluorescencia no siempre eran posibles (Joo *et al.*, 1990). En cuanto al virus de la influenza tipo A, éste fue aislado en Canadá y utilizado para reproducir la sintomatología respiratoria del SRRP en lechones. Apoyaba la hipótesis de su importancia en la presentación de la enfermedad el que algunas cerdas que abortaban presentaran un aumento en la tasa de anticuerpos frente al mismo. Sin embargo, se

Introducción

ha demostrado que la enfermedad que produce este virus, denominada neumonía proliferativa y necrotizante, es una entidad patológica distinta del SRRP (Martineau *et al.*, 1992).

La controversia quedó resuelta en el verano de 1991 cuando Wensvoort *et al.* en el Instituto Veterinario Central (Lelystad, Holanda) aislaron un nuevo virus, al que ellos denominaron virus Lelystad (LV) en 16 de 20 lechones afectados y en 41 de 63 cerdas estudiadas. Además observaron que el 75% de las cerdas afectadas habían seroconvertido a este virus y reprodujeron experimentalmente la enfermedad inoculando intranasalmente el virus Lelystad a 8 cerdas gestantes, pudiendo recuperarlo de las cerdas y los fetos de las mismas (Pol *et al.*, 1991; Terpstra *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991).

Poco después de su aislamiento en Holanda se aisló en Alemania (Ohlinger *et al.*, 1991b), España (Plana *et al.*, 1992b), el Reino Unido (Paton *et al.*, 1991), Francia (Albina *et al.*, 1992a,b; Baron *et al.*, 1992), Dinamarca (Bøtner *et al.*, 1994) y Canadá (Dea *et al.*, 1992a-c). En EE.UU. se identificó un virus antigénica y estructuralmente relacionado con el virus Lelystad como agente productor de la enfermedad. Este virus, aislado en la línea celular CL-2621, se ha considerado cepa de referencia, recibiendo la denominación ATCC VR-2332 (Collins *et al.*, 1992). En estudios realizados con esta cepa, se ha demostrado que produce un fallo reproductivo cuando se inocula a cerdas gestantes por la vía intranasal (Christianson *et al.*, 1992) y que cerdas de granjas afectadas presentan anticuerpos frente al mismo (Morrison *et al.*, 1992c). Posteriormente, Yoon *et al.* (1992a) aislaron otros virus que, junto con el virus Lelystad, daban reacciones cruzadas con anticuerpos monoclonales desarrollados frente a la nucleocápside de la cepa VR-2332.

1.2.2. Clasificación taxonómica

En cuanto a la morfología, la organización del genoma, la estrategia de replicación y la composición proteica, el virus del SRRP (VSRRP) se parece al virus elevador de la lactato-deshidrogenasa del ratón (VLD), al virus de la arteritis equina (VAE) y al virus de la fiebre hemorrágica del los simios (VFHS). Como consecuencia se clasificó, junto con los otros tres virus mencionados, en el género *Arterivirus* de la familia *Togaviridae*, estando más directamente relacionado con el VLD y más distantemente con el VAE, al que se asemeja en la organización del genoma (Conzelmann *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993a; Meulenberg *et al.*, 1994). Sin embargo, no presenta reacciones cruzadas con ninguno de los dos virus mencionados, no infecta a ratones y no crece en macrófagos peritoneales de ratón (célula donde se cultiva *in vitro* el VLD).

Los virus pertenecientes a este grupo se asemejan a los togavirus en las características del virión, el tamaño del genoma y la presencia de una nucleocápside con simetría icosaédrica

(Benfield *et al.*, 1992a,b; Ohlinger *et al.*, 1992b; Plagemann y Moennig, 1992), pero la organización del genoma y la estrategia de replicación guardan mayor relación con los coronavirus y los torovirus (Godeny *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993a,b). Debido a estas consideraciones se ha propuesto recientemente incluir al VSRRP, junto con el VLD, el VAE y el VFHS, en un nuevo grupo de virus ARN de polaridad positiva que constituiría la familia *Arteriviridae* y que se diferenciaría de los coronavirus y los torovirus en sus características morfológicas como son el diámetro del virión y la longitud del genoma (Plagemann y Moennig, 1992; Meulenberg, 1993a; Meulenberg *et al.*, 1994). Sin embargo, el término *Arteriviridae* se refiere a la enfermedad producida por el VAE exclusivamente, por tanto, se ha propuesto la denominación *Multiviridae*, haciendo referencia a la formación de múltiples ARNs mensajeros subgenómicos (Plagemann y Moennig, 1992) y también la de *Mamurnaviridae* (macrophage multiple RNA viruses), denominación que incluye, además, en la denominación la célula diana de estos virus (Conzelmann *et al.*, 1993).

1.2.3. Variabilidad

Una de las características más importantes del VSRRP es la gran variabilidad que ha sido descrita entre las distintas cepas aisladas. Así, en estudios realizados utilizando anticuerpos policlonales y monoclonales, se ha demostrado que, aunque las cepas europeas y americanas comparten determinantes antigénicos, existen diferencias antigénicas importantes, tanto entre las cepas americanas y las europeas como entre las distintas cepas europeas y americanas entre sí, demostrándose diferencias en distintos epítomos de todas las proteínas víricas (Wensvoort *et al.*, 1992; Bautista *et al.*, 1993, 1994; Nelson *et al.*, 1993; Benfield *et al.*, 1994; Kwang *et al.*, 1994; Drew *et al.*, 1995; Katz *et al.*, 1995; Magar *et al.*, 1995a). Así, en EE.UU. se han establecido 6 grupos antigénicos teniendo en cuenta las variaciones antigénicas en la nucleocápside (Nelson *et al.*, 1996). De la misma manera se han documentado diferencias en la virulencia de distintas cepas, tanto europeas como americanas (Halbur *et al.*, 1994b, 1995b, 1996; Joo y Yoon, 1994; Mengeling *et al.*, 1996d).

Recientemente se han clonado y secuenciado parcialmente los genomas correspondientes a varios aislados europeos y americanos, encontrándose una heterogeneidad genómica similar a la heterogeneidad antigénica descrita previamente. Comparando los fragmentos de lectura abierta (ORFs) del genoma del virus de la cepa VR-2332 con la del LV y otros virus de la misma familia, se ha visto que, aunque está más relacionado con el LV que con otros arterivirus, la homología encontrada es menor de lo que cabría esperar para dos virus que producen la misma enfermedad. Sustituciones, delecciones y adiciones se han producido a lo largo de la secuencia (Murtaugh *et al.*, 1995a). Las proteínas producidas también se diferencian tanto en el peso molecular (PM) como en

Introducción

el punto isoelectrico y los puntos de glicosilación.

Teniendo en cuenta cada una de las ORFs, en la ORF 2 se ha demostrado una homología del 65% y una identidad de aminoácidos (aa) del 63% entre la cepa europea LV y la americana VR-2385 (Morozov *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995a). En cuanto a la ORF 3 se han encontrado identidades de aa en la proteína que codifica entre distintas cepas americanas y la europea LV que oscilan entre el 54% y el 64% y homólogos del 64% entre la cepa VR-2332 y la LV (Mardassi *et al.*, 1995; Morozov *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995a). En la ORF 4 se han encontrado homólogos de entre el 69% y el 85% e identidades de aa que oscilan entre el 64% y el 68% entre cepas americanas y europeas, siendo el porcentaje de similitud del 86% entre distintas cepas americanas entre sí (Kwang *et al.*, 1994; Mardassi *et al.*, 1995; Morozov *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995a). En la ORF 5 se ha descrito una variabilidad muy grande, existiendo una homología de sólo el 54% entre la cepa VR-2332 y la LV (Meng *et al.*, 1994). La identidad de aa oscila entre el 52% y el 59% entre cepas americanas y europeas, aunque entre distintas cepas americanas es de un 90% (Mardassi *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995a). La ORF 6, por el contrario, está muy conservada, oscilando su identidad de aa entre el 57% y el 81% entre cepas europeas y americanas y alcanzando el 96% entre las distintas cepas americanas (Mardassi *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995a). En la ORF 7 la homología de nucleótidos oscila entre el 63% y el 65% entre las cepas americanas y europeas, con una identidad de aa entre el 59% y el 81% (Mardassi *et al.*, 1994b, 1995; Meng *et al.*, 1994, 1995; Murtaugh *et al.*, 1995a). Sin embargo, si se comparan las cepas americanas entre sí la identidad oscila entre el 96% y el 100% (Mardassi *et al.*, 1995; Meng *et al.*, 1995).

Los árboles filogenéticos contruidos basándose en los genes que codifican las proteínas E, M y N han demostrado que los aislados europeos y los americanos caen en dos grupos distintos, sugiriendo que representan dos genotipos distintos (Meng *et al.*, 1995; Suárez *et al.*, 1996b). Este hecho ha sido apoyado en un estudio realizado teniendo en cuenta las ORFs de la 2 a la 7 que ha demostrado unas diferencias del 35% entre cepas americanas y la europea LV, a la vez que prueba que las cepas americanas son bastante similares entre sí, con un porcentaje de similitud que supera el 90% (Kapur *et al.*, 1996).

Se han observado fenómenos de recombinación intragénicos y de conversión génica en las ORFs 2, 3, 4, 5 y 7, pero no en la ORF 6. Sin embargo, es muy frecuente la aparición de mutaciones silenciosas en todas las ORFs, es decir, sustituciones que no cambian la secuencia de aa, indicando una presión evolutiva hacia la conservación de ciertas secuencias de aa (Kapur *et al.*, 1996). Por otra parte, es de destacar que las mutaciones con mucha frecuencia aparecen en el mismo aa, sugiriendo una selección positiva para escapar a la respuesta inmune (Murtaugh *et al.*,

1995b).

1.2.4. Características morfológicas y físico-químicas del virus

Mediante estudios de microscopía electrónica se ha observado que el VSRRP es un virus esférico, con envoltura y con un tamaño medio de 62 nm que puede oscilar entre 45 y 80 nm. Contiene una nucleocápside isométrica de 25 a 35 nm, aunque a veces se ha visto icosaédrica y presenta unas proyecciones de superficie de unos 5 nm (Ohlinger *et al.*, 1991b; Wensvoort *et al.*, 1991; Benfield *et al.*, 1992a,b; Kim *et al.*, 1993). Es difícil de visualizar en preparaciones que contengan restos celulares, pero en preparaciones víricas purificadas, utilizando la técnica de la tinción negativa, aparece en forma de partículas ovoides de 50-60 nm (Benfield *et al.*, 1992a,b; Christianson *et al.*, 1992). Los viriones del virus Lelystad aparecen en cortes de macrófagos infectados como partículas esféricas de 45-55 nm con una nucleocápside de 30 a 35 nm y rodeadas de una membrana con una doble capa lipídica.

El virus se inactiva con un tratamiento con cloroformo o éter, indicando que contiene una envoltura lipídica.

Tiene una densidad de 1,18 a 1,19 g/mL en gradientes de cloruro de cesio y de 1,14 g/mL en gradientes de sacarosa (Ohlinger *et al.*, 1991b; Wensvoort *et al.*, 1991; Benfield *et al.*, 1992a,b).

El VSRRP no hemoaglutina eritrocitos de cerdo, oveja, cabra, ternera, ratón, rata, conejo, cobaya, pato, pollo ni humanos tipo O (Yoon *et al.*, 1992a; Wensvoort *et al.*, 1991; Benfield *et al.*, 1992a,b).

1.2.5. Genoma y proteínas víricas

El ácido nucleico es un ARN de cadena sencilla de polaridad positiva, de unas 15088 pares de bases que termina en una cadena de adeninas de longitud variable con un máximo de 20 en su extremo 3'. Se ha visto que la organización del genoma es similar al del VAE que contiene 8 ORFs que se solapan entre sí (Meulenberg *et al.*, 1993b) de las cuales la ORF1a y la ORF 1b ocupan cerca del 80% del genoma del virus y codifican la polimerasa vírica, la cual transcribe el ARN genómico en moléculas complementarias de polaridad negativa que sirven de molde para la síntesis de los ARNs genómicos y subgenómicos. El resto del genoma está constituido por 6 ORFs pequeñas, parcialmente superpuestas, de las cuales, la que se encuentra en el extremo 3' codifica la proteína de la nucleocápside y está precedida por una ORF que codifica una proteína de membrana

Introducción

muy conservada (proteína M). Recientemente se ha identificada una nueva ORF, a la que han denominado ORF 3-1 con capacidad para codificar 45 aa, aunque no se sabe si codifica alguna proteína o realiza alguna función biológica (Meng *et al.*, 1996). Los patrones de hibridación a partir de los oligonucleótidos demuestran una correlación entre las ORFs de la 1 a la 7 y los ARNs del 1 al 7.

En la actualidad se conoce la secuencia completa del virus Lelystad y secuencias parciales, tanto de otros aislados europeos como de aislados americanos. El conocimiento de estas secuencias ha permitido constatar a nivel molecular la gran diversidad que ya se había observado en estudios serológicos. Además se han llevado a cabo muchos trabajos encaminados a la identificación y caracterización de las proteínas del virus. Así, utilizando anticuerpos monoclonales y sueros hiperinmunes se han identificado varias proteínas en lisados celulares. Las primeras en reconocerse fueron una proteína de 15 kDa que parece ser la proteína de la nucleocápside (proteína N) y dos proteínas aparentemente de la envoltura, una de 18-19 kDa (proteína M) y otra de 24-26 kDa (proteína E) (Nelson *et al.*, 1993). Por su parte, Benfield *et al.* (1994), utilizando sueros hiperinmunes obtenidos en cerdos gnotobióticos, han identificado 5 proteínas las cuales tienen un PM de 15, 16, 19, 22 y 26 kDa en la cepa VR-2332 y de 15, 15,5, 18, 22 y 26 kDa en la cepa LV.

Posteriormente, y por la expresión de las correspondientes ORFs, bien en el sistema de baculovirus o bien en un sistema de transcripción y traducción *in vitro* se han estudiado las proteínas codificadas por las ORFs de la 2 a la 7. Dichas ORFs poseen una secuencia que codifica proteínas de entre 128 y 265 aminoácidos en la cepa LV y de entre 123 y 256 en la cepa VR-2332 (Murtaugh *et al.*, 1995a), algunas de las cuales son proteínas estructurales del virus y otras tienen una función aún desconocida. Todas las ORFs presentan sitios de N-glicosilación, lo cual indica que todas las proteínas pueden ser glicoproteínas. Las proteínas codificadas por las ORFs de la 2 a la 5 contienen una región N-terminal muy hidrofóbica seguida, excepto en la de la ORF 4, de una señal de ruptura, que puede actuar como secuencia líder y participar en el transporte hacia el retículo endoplasmático. Las regiones hidrofóbicas halladas en los carboxi-terminales de las proteínas de las ORFs 2 y 4 y en la zona central de la proteína de la ORF 5 pueden corresponder a regiones de anclaje.

Las proteínas M, E y N se han detectado por Western-blot en virus purificados, en extractos de células infectadas, tanto con aislados europeos como americanos y como proteínas expresadas en el sistema de transcripción y traducción *in vitro* o en el sistema de baculovirus, lo cual permite concluir que se trata de proteínas estructurales (Bautista *et al.*, 1994; Meulenberg *et al.*, 1995b). En el resto de proteínas no está clara su función.

Introducción

La ORF 2 codifica un péptido de 30 de kDa de PM, cuando se expresa en un sistema de transcripción y traducción *in vitro* en presencia de membranas microsomales, es decir, cuando está glicosilado, mientras que su PM sin glicosilar es de 26 kDa. La función de esta proteína todavía no ha podido ser establecida. Cuando la ORF 2 se expresa en ausencia de membranas microsomales se produce, además de la proteína de 26 kDa, otra de menor PM cuya significación no se conoce (Meulenberg *et al.*, 1995b).

La ORF 3 codifica una proteína de aproximadamente 30 kDa (Murtaugh, 1995a). Esta proteína presenta una delección de 12 aa en la región carboxi-terminal en la cepa VR-2332 y contiene 7 puntos potenciales de glicosilación, lo cual podría dar lugar a un aumento en su PM. Esto podría explicar el que otros autores (Meulenberg *et al.*, 1995a; Wieczorek-Krohmer *et al.*, 1996) hayan descrito el producto de la ORF 3 como una proteína de entre 40 y 50 kDa de PM. Este hecho ha quedado confirmado al expresar la proteína en un sistema de transcripción y traducción *in vitro*. Con este sistema se ha observado que el PM de la proteína sin glicosilar es de 27 kDa, mientras que cuando está glicosilada llega a 45 kDa (Meulenberg *et al.*, 1995b). Aunque su función no está totalmente determinada, es posible que sea una proteína estructural (van Nieuwstadt *et al.*, 1995).

La ORF 4 codifica una proteína que presenta un PM de aproximadamente 19 kDa cuando está sin glicosilar y de entre 30 y 40 kDa cuando está glicosilada (Meulenberg *et al.*, 1995b; Murtaugh *et al.*, 1995a). Presenta una secuencia carboxi-terminal y amino-terminal hidrofóbica, con 4 sitios posibles de glicosilación y 5 dominios, presuntamente, de proyecciones de membrana. Utilizando técnicas de inmunomicroscopía electrónica se ha determinado que es una proteína estructural que forma parte de la superficie del virión (Wieczorek-Krohmer *et al.*, 1996).

El producto de la ORF 5 se ha denominado proteína E. Presenta un PM de 20 kDa cuando no está glicosilada y de 25 kDa cuando sí lo está. Contiene una región hidrofóbica N-terminal y dos sitios de N-glicosilación en la cepa LV y tres en la VR-2332. Con tratamientos con endoglicosilasas se ha demostrado que esta proteína es transportada al aparato de Golgi, donde se modifican los oligosacáridos unidos a la región N-terminal (Meulenberg *et al.*, 1995b). Entre los aa 65 y 130 presenta dominios potenciales de proyecciones de membrana (Murtaugh *et al.*, 1995a). En gradientes de sacarosa migra con la fracción de densidad 1,10 g/mL (Bautista *et al.*, 1996a), lo cual indica que se trata de una proteína estructural. Aunque no se conoce la topología de esta proteína, se supone que se ancla a la membrana mediante la región hidrofóbica interna. Es característica la capacidad de esta proteína para inducir la aparición de apoptosis, como se ha demostrado por la aparición de fenómenos de citotoxicidad caracterizada por la condensación de la cromatina, la degradación del ADN cromosómico con fragmentación internucleosomal y la

degradación del ARN ribosómico de las células infectadas con un virus vaccinia recombinante que contiene la ORF 5 (Suárez *et al.*, 1996a). La apoptosis es inducida también en cultivos celulares infectados con una cepa adaptada y con una cepa de campo, quedando por demostrar si *in vivo* se produce también este fenómeno.

La proteína codificada por la ORF 6 (proteína M) es una proteína de 18 kDa, la cual, aunque presenta un sitio posible de glicosilación, no se glicosila, al menos *in vitro* (Murtaugh *et al.*, 1995a). Es extremadamente hidrofóbica, ya que presenta 3 dominios muy hidrofóbicos en la mitad N-terminal que se supone que son dominios de proyecciones de membrana. Presenta un perfil comparable al de algunas proteínas de membrana tales como las M de los coronavirus, del VAE o del VLD. Estos datos sugieren una topología y función similares. Podría ser una proteína integral de membrana de modo que los tres segmentos hidrofóbicos constituyeran el punto de anclaje y el extremo carboxi-terminal estuviera asociado a la superficie de la misma. Su condición de proteína integral de membrana explicaría su baja inmunogenicidad, ya que sólo es reconocida débilmente por el suero de los animales enfermos.

La proteína codificada por la ORF 7 (proteína N) es una proteína básica, cuya secuencia muestra una homología importante con otras nucleoproteínas por lo que desde un principio se supuso que debía ser la proteína constituyente de la nucleocápside. Este hecho quedó confirmado por su presencia en gradientes de sacarosa en la última fracción, con una densidad de 1,18 g/mL. La mitad amino-terminal es una región muy conservada que presenta de un 26% a un 28% de aa muy básicos. Se cree que estos residuos básicos pueden facilitar la interacción con el ARN del genoma del virus (Murtaugh *et al.*, 1995a). Es una proteína muy abundante que es reconocida fuertemente por los sueros de los animales infectados ya que da lugar a una respuesta inmune bastante fuerte. Además, al mostrar una secuencia bastante conservada, induce una reactividad cruzada entre los antisueros desarrollados frente a distintas cepas, tanto europeas como americanas, aunque no suficiente para garantizar un diagnóstico grupo específico.

1.2.6. Replicación del virus

Durante la replicación vírica, según se ha observado en las células infectadas, se produce la formación de 6 ARNs mensajeros subgenómicos que contienen en su extremo 3' una cola de adeninas y en el extremo 5' una secuencia líder idéntica para todos ellos que deriva del extremo 5' del genoma del virus y que se une a las zonas 3' mediante un sitio de unión que precede a cada ORF el cual contiene la secuencia AACC (Conzelman *et al.*, 1993; Meulenberg *et al.*, 1993b; Meng *et al.*, 1994). En un estudio reciente se ha puesto de manifiesto que los ARNs mensajeros subgenómicos son polimórficos y que el número (6 ó 7) y el tamaño exacto de los mismos depende

del aislado que se estudie (Meng *et al.*, 1996).

Estos ARNs mensajeros expresan las proteínas codificadas por las ORFs del genoma. De ellas las más estudiadas son las proteínas E, M y N. La primera sufre una disminución de PM durante su maduración debido a la pérdida de hidratos de carbono ricos en manosa. Esto sucede en el retículo endoplasmático, donde también sufre un proceso de glicosilación y plegamiento, el cual es necesario para su transporte al aparato de Golgi. La pérdida de hidratos de carbono continúa en la cisterna proximal del aparato de Golgi. La proteína M y la proteína N no sufren cambios de PM durante su maduración. Se ha observado que la incorporación de la proteína M y la proteína E al virión es en forma de heterodímeros unidos por puentes disulfuro. Sin embargo, la proteína E se incorpora de forma más eficiente a estos complejos que la proteína M, la cual lo hace más lentamente. Este fenómeno se podría explicar por el hecho de que la proteína M tiende a formar dímeros unidos por puentes disulfuros en las células durante la replicación vírica, mientras que no se presenta de esta forma en las partículas víricas, por lo cual se tiene que producir una disociación de estos dímeros para que se pueda ensamblar con la proteína E. Parece ser que la interacción entre estas dos proteínas precede al ensamblaje del virus, aunque no está confirmado. Es probable que el ensamblaje del virus empiece en el retículo endoplasmático, donde están las proteínas E y M unidas por puentes disulfuro. Posteriormente estos dímeros interaccionan con la proteína N que permanece en el citosol, fundamentalmente en la región perinuclear. Las vesículas que contienen la nucleocápside se han observado en el retículo endoplasmático liso a las 6 horas post-infección (p.i.) y desde aquí son transportadas al aparato de Golgi. A las 9 horas p.i. ya se observan partículas víricas en la luz del retículo endoplasmático liso y en la región de Golgi, liberándose la primera progenie del virus por exocitosis entre las 9 y las 12 horas p.i. (Pol *et al.*, 1992). Al final del tránsito del retículo endoplasmático al aparato de Golgi la proteína E adquiere su estructura madura (Mardassi *et al.*, 1996). La replicación del virus se limita al citoplasma (Pol *et al.*, 1992).

Por otra parte, es posible detectar la síntesis de las proteínas víricas en células infectadas a las 20 horas p.i., aunque el momento óptimo de detección de las 3 proteínas principales es entre las 42 y las 48 horas p.i.. La primera proteína que se detecta, a las 20 horas p.i. es la de 19 kDa, seguida, a las 24 horas p.i., por la de 26 kDa, mientras que la de 15 kDa sólo se puede detectar a partir de las 30 horas p.i. (Bautista *et al.*, 1996).

1.2.7. Crecimiento en cultivos celulares

El VSRRP crece con títulos que oscilan entre 10^5 y 10^7 dosis infectantes 50 en cultivos de tejidos (DI₅₀CT) en tres tipos de líneas celulares:

1. Macrófagos alveolares porcinos (MAP) (Wensvoort *et al.*, 1991).

Introducción

2. La línea celular procedente de riñón de mono denominada CL-2621 (Benfield *et al.*, 1992a,b)
3. El clon MARC-145 de la línea celular procedente de riñón de mono MA-104 (Kim *et al.*, 1993).

El efecto citopático (ECP) que produce en los MAP es muy rápido, empezando con un redondeamiento de las células, seguido de un agrupamiento y lisis de las mismas que se produce entre 1 y 4 días p.i.. La replicación vírica se limita al citoplasma de las células infectadas. Las células infectadas presentan mitocondrias hinchadas que han perdido sus crestas y gránulos, indicando una degeneración celular (Pol *et al.*, 1992).

El ECP que se produce en las líneas celulares se desarrolla más lentamente, apareciendo entre 2 y 6 días p.i., aunque es bastante similar al que se produce en los cultivos de MAP, ya que se produce un redondeamiento y agrupamiento de las células primero, seguido de un fenómeno de picnosis y la lisis de las mismas (Benfield *et al.*, 1992; Kim *et al.*, 1993). Al igual que sucede en los MAP, la replicación del virus en la línea celular CL-2621 se limita al citoplasma, como se ha demostrado mediante la técnica de la inmunofluorescencia (Benfield *et al.*, 1992a).

1.2.8. Capacidad de supervivencia

Al ser un virus con envoltura su capacidad de supervivencia en el medio ambiente no es muy grande y, además, está condicionada, en gran medida, por los cambios de pH a los que es relativamente sensible. Así, los títulos infectivos se reducen en un 90% a pH mayor de 7 ó menor de 5 (Benfield *et al.*, 1992a,b). La vida media de la cepa Lelystad, a 4°C, es máxima con un pH=6,25 (50 horas) y mínima a pH=8,5 (33,3 horas) y a pH=5 (18,8 horas). El almacenamiento a pH=6 y temperatura de 37°C da lugar a una vida media de 6,25 horas, que disminuye si se sube o baja el pH. El virus es estable en medios de cultivo con un pH de 7,5 durante largos periodos de tiempo si se mantiene a temperaturas de -70°C ó -20°C. Así, el título del virus no sufre ningún cambio durante las primeras 10 semanas de almacenamiento, aunque al cabo de 6 meses se observa una disminución de 1 logaritmo (log) en las DI_{50CT} respecto al título inicial en lotes de virus almacenados a ambas temperaturas. Sin embargo, en los 6 meses siguientes no se producen cambios a -70°C y sí una pérdida de 0,5 log DI_{50CT} a -20°C. Por el contrario las temperaturas altas afectan negativamente a la supervivencia del virus y así se ha demostrado una pérdida de 5 log DI_{50CT} respecto al título inicial si se almacena el virus en medio de cultivo a pH=7,5 durante 13 semanas a 4°C, durante 2 semanas a 21°C o durante 2 días a 37°C. Por último, 1 hora a 56°C produce una disminución en el título inicial de 3 log DI_{50CT} (Bloemraad *et al.*, 1994). Trabajando con la cepa VR-2332 se ha observado una reducción del 50% en la infectividad tras 12 horas a 37°C y una inactivación completa al cabo de 48 horas a 37°C o de 45 minutos a 56°C. Sin

embargo, no se observó ningún cambio en la infectividad después de 1 mes a 4°C ó 4 meses a -70°C (Benfield *et al.*, 1992a,b).

Se ha estudiado la supervivencia del virus en la carne (Bloemraad *et al.*, 1994) y se ha comprobado que es posible encontrarlo en las amígdalas, los ganglios linfáticos, el pulmón, el suero y, ocasionalmente, en el tejido muscular cuando se sacrifican animales poco después de la infección. Sin embargo, no se detecta en el hígado, el corazón, el riñón o la médula ósea ni tampoco en el tejido muscular cuando pasan más de 48 horas desde el sacrificio. Su título en el tejido muscular o en los órganos no sufre prácticamente alteraciones por el almacenamiento de hasta 48 horas a 4°C. El aislamiento esporádico en el tejido muscular se debe probablemente a la presencia del virus en el plasma sanguíneo que se encuentra en los capilares. La vida media en esta localización, teniendo en cuenta el pH del tejido muscular, es de entre 23 y 43 horas. También hay que tener en cuenta la influencia de la temperatura, que afecta a la supervivencia del virus, ya que al cabo de 24 horas a 25°C sólo el 47% de las muestras de tejido positivas en el momento del sacrificio lo siguen siendo. Este porcentaje se reduce al 14% a las 48 horas y al 7% a las 72 horas. Sin embargo, si se mantienen las muestras a 4°C ó a -20°C el virus se puede aislar del 85% de las muestras positivas (van Alstine *et al.*, 1993).

El VSRRP es bastante sensible a los agentes químicos utilizados normalmente para la desinfección de locales en las granjas. Como consecuencia, no se puede demostrar la presencia de virus infectivo después de tres semanas de vaciar y desinfectar un edificio donde se habían alojado cerdos positivos (Albina *et al.*, 1992c).

1.3. EPIZOOTIOLOGÍA

1.3.1. Incidencia y prevalencia

El origen del VSRRP no se conoce, sin embargo, se asume de forma general que las pandemias que aparecieron en América del Norte y en Europa tienen el mismo origen, aunque, aparentemente, no se importaron cerdos procedentes de EE.UU. a Alemania y además se sabe que las cepas americanas y europeas del virus tienen un porcentaje de similitud bastante bajo.

Los primeros casos positivos por serología al VSRRP aparecieron en 1985 en el estado de Iowa y en 1986 en el estado de Minnesota (EE.UU.) (Owen *et al.*, 1992). La incidencia clínica del SRRP aumentó rápidamente en este país en los años 1988 y 1989 (Keffaber, 1989; Dial *et al.*, 1990) al igual que la seroprevalencia (Hill *et al.*, 1992) y en 1992 la enfermedad se había notificado en 19 estados (Morrison *et al.*, 1992b). En un estudio realizado utilizando sueros obtenidos en

Introducción

1990 se estimó que la prevalencia era del 36% de las granjas (Bautista *et al.*, 1993), mientras que en 1992 el 56,3% de las granjas fueron positivas, con un 35,1% de sueros positivos (Cho *et al.*, 1993). En 1993 la seroprevalencia oscilaba entre el 40% y el 60% en las zonas más productoras de cerdos, en muchos casos sin que se presentaran síntomas de la enfermedad (Boeckman, 1993). Actualmente se considera que se encuentra entre el 60% y el 80% (Zimmerman, 1995). La incidencia de la presentación clínica de la enfermedad parece estar disminuyendo en EE.UU., aunque no se sabe si se debe a un descenso real o a la existencia de cepas del virus avirulentas que producen infecciones subclínicas (Anelli, 1992; Sanford, 1992). De todas formas dado que más del 50% de las granjas del país están infectadas, cabe esperar que disminuya la incidencia. En Canadá también está presente la enfermedad desde el año 1987, año en que se detectó en las provincias de Québec y Ontario, extendiéndose posteriormente incluso a lugares de difícil acceso. Así, en 1993 se descubrió en la isla del Príncipe Eduardo (López *et al.*, 1994) y en la actualidad se considera que entre el 40% y el 80% de las granjas de la zona oeste y centro de Canadá son positivas (Carman *et al.*, 1995), habiendo presentado sintomatología más del 50% de las mismas. El grado de infección de otras provincias se ha estimado que se encuentra entre el 20% y el 40% (Sanford y Moore, 1995). Estudios serológicos llevados a cabo con aislados canadienses han revelado una relación antigénica clara entre los aislados canadienses y los americanos (Mardassi *et al.*, 1994a).

En la Unión Europea la enfermedad se describió en 1990 en Alemania, aunque en estudios de seroprevalencia se han encontrado granjas positivas desde 1988 (Ohlinger, 1992a). La infección se ha extendido rápidamente desde su lugar de aparición por las zonas donde la densidad porcina es mayor y a finales de 1992 se consideraba enzoótica en Alemania, Holanda, Bélgica, España, El Reino Unido, Francia y Dinamarca. En un estudio llevado a cabo en 1992, utilizando muestras de suero procedentes de Francia, Bélgica, Holanda, Chipre y El Reino Unido se determinó que el 34,6% de las granjas y el 21,3% de los animales presentaban anticuerpos frente al VSRRP medidos por una técnica de ELISA. Sin embargo, estos datos no pueden ser interpretados como un indicativo de la prevalencia real de la enfermedad, ya que las muestras están sesgadas, al proceder de granjas donde se sospechaba su presencia (Buffereau, 1992). Lo que sí se puede decir con certeza es que alcanzó su máxima incidencia desde finales de 1990 hasta 1992 y que desde entonces el número de brotes que han aparecido es menor debido posiblemente al establecimiento de una inmunidad en gran parte de la población porcina y a posibles cambios en patogenicidad del virus. Así, en Holanda, la máxima incidencia se presentó en el invierno de 1990-1991, momento en que se notificaron más de 1300 casos, estimándose que el 80% de la población se vio afectada por este brote. Actualmente se cree que la mayoría de las granjas están infectadas de forma endémica y que entre el 50% y el 70% de las cerdas son seropositivas (Wensvoort, 1994), oscilando la seroprevalencia en los cebaderos entre el 80% y el 100%. En cuanto a los lechones, el

50% de las granjas presentan animales positivos entre las 4 y las 9 semanas de vida (Nodelijk *et al.*, 1996a). En Alemania la incidencia máxima se presentó en el mismo momento que en Holanda, con más de 3000 casos notificados y en Bélgica en 1991, con 50 brotes notificados, diagnosticándose por última vez en diciembre de 1991. En Francia el pico de incidencia se produjo entre noviembre de 1991 y mayo de 1992, presentándose los casos fundamentalmente en la región de Bretaña. En la actualidad la presencia del virus se ha notificado en las regiones de Bretaña, Le Nord Pas-de-Calais, Mayenne, Maine-et-Loire, Loire-Atlantique, Vendée, Manche y Orne (Nicolas, 1993). En Austria los primeros casos no se produjeron hasta 1993 y un año después se habían notificado 129 brotes. En El Reino Unido la enfermedad apareció en junio de 1991 y, a pesar de que se tomaron medidas muy estrictas para evitar la extensión de la misma, en 1995 se admitió que el virus se había extendido por todo el país desde su aparición cuatro años antes, estimándose que entre el 40% y el 50% de las granjas estaban infectadas (White, 1995). En Luxemburgo está presente desde 1992 y en Polonia y en Italia se ha detectado su presencia mediante estudios serológicos, detectándose los primeros casos clínicos en Italia a finales de 1992. La seroprevalencia ha ido aumentando en Italia en estos últimos años. Así, en 1994 el 36,9% de las granjas eran positivas y en 1995 el porcentaje había aumentado al 64,2% (Pozzi, 1996). En Eslovenia, aunque nunca se ha presentado clínicamente la enfermedad, se ha establecido que un 1,2% de las granjas son seropositivas (Valencak, 1996). En la República Checa, ha sido notificada una prevalencia del 17% de las muestras y 30% de las granjas (Valícek *et al.*, 1996). En Rusia hubo una sospecha de una granja infectada en 1991. Los animales fueron sacrificados y nunca se han detectado anticuerpos frente a la enfermedad con posterioridad. En Dinamarca el porcentaje actual de granjas seropositivas se encuentra entre el 25% y el 30% y con tendencia a aumentar. Éste es el único país que emprendió un plan de control de la enfermedad que comenzó en marzo de 1996 con una duración prevista de 3 años cuya finalidad era conseguir que el porcentaje de granjas positivas no fuera mayor del 25% a finales de 1998. Para alcanzar este objetivo el primer paso que dieron fue la detección de las granjas positivas mediante serología, seguido de la vacunación de todos los cerdos de reemplazo y los verracos de las granjas positivas, preveyéndose además la vacunación de los lechones destetados (Mousing *et al.*, 1996). Sin embargo, este plan ha sido recientemente abandonado debido a la aparición de brotes de la enfermedad, debidos a la cepa vacunal empleada, tras su aplicación a los animales.

En Sudamérica se han detectado signos de la enfermedad en Chile. Por otra parte, en Brasil y México se han realizado importaciones de cerdos procedentes de Europa y EE.UU. respectivamente, con lo cual la probabilidad de que haya sido introducida la enfermedad en estos países es alta. Sin embargo no se han llevado a cabo estudios serológicos para detectar la presencia del virus.

Introducción

En Asia se detectó la presencia de la enfermedad en muestras de suero procedentes de animales con neumonía crónica en Japón en 1992, aislándose un virus antigénicamente relacionado con las cepas europeas del VSRRP capaz de reproducir experimentalmente la enfermedad (Kuwahara *et al.*, 1994). Un estudio retrospectivo realizado con posterioridad ha indicado que existían muestras de suero positivas desde el año 1987. En la actualidad se sabe que está presente en el 95,7% de las regiones de Japón, aunque sólo han mostrado signos clínicos de la enfermedad el 10% de las granjas positivas (Meredith, 1995). El virus se ha aislado con frecuencia de animales que padecen la enfermedad denominada Heko-Heko, descrita en 1989 y que se caracteriza por producir una neumonía crónica en lechones de 1-2 meses de edad. Normalmente va acompañado de *Mycoplasma hyorhinis*, lo cual agrava el problema (Shimizu *et al.*, 1994). En Filipinas se notificó su presencia por primera vez en 1993 y en la República de Corea un estudio realizado en 1993 demostró una seroprevalencia del 6,25% de los animales y un 17,6% de las granjas (Kang *et al.*, 1994). Entre los años 1994 y 1995 la seroprevalencia fue del 10,6% de los animales y el 22% de las granjas (Kang *et al.*, 1996) y en la actualidad son positivas a la enfermedad el 43% de las cerdas en producción y el 69,9% de las granjas (Cheon *et al.*, 1996). Las cepas del virus aisladas muestran una gran similitud con las cepas americanas, estando bastante alejadas de las europeas (Kim *et al.*, 1996).

España se considera oficialmente exenta de la enfermedad. Sin embargo, en una encuesta realizada por los Laboratorios Hipra, Amer (Girona) se demostró que un 62,5% de las hembras en granjas de producción de lechones, un 61,2% de las hembras de granjas de ciclo cerrado y un 75% de los cerdos de cebadero eran positivos, produciéndose un aumento en la seropositividad posteriormente, ya que el mismo estudio, llevado a cabo un año después, dio los siguientes resultados: 76,5% de las hembras en granjas de producción de lechones, un 69,8% de hembras de las explotaciones de ciclo cerrado y un 82,2% de los cerdos de cebadero fueron seropositivos.

1.3.2. Persistencia de la infección

El VLD, el VAE y el VFHS pueden producir infecciones asintomáticas persistentes que pueden durar toda la vida del individuo (Plagemann y Moennig, 1992). En el caso del VSRRP todavía no se ha demostrado fehacientemente su capacidad para producir este tipo de infecciones. Sin embargo, se ha podido aislar de la orofaringe de un animal infectado 157 días después de la infección experimental (Wills *et al.*, 1995a), de las glándulas bulbouretrales de un verraco infectado 101 días antes (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a) y del suero de un animal de 210 días de vida que nació infectado (Benfield *et al.*, 1997). También se ha comprobado que el virus se puede eliminar durante largos periodos de tiempo. Así, un estudio de eliminación ha demostrado que, aunque los animales infectados a las 4 semanas de vida no eliminan cantidad suficiente de

Introducción

virus para infectar a animales susceptibles puestos en contacto con ellos cuando tienen aproximadamente 13 semanas de vida sí pueden hacerlo incluso a las 22 semanas de vida, si se someten a condiciones de estrés o se tratan con corticoesteroides y aún en presencia de títulos altos de anticuerpos neutralizantes (Albina *et al.*, 1994). Sin embargo, el tratamiento con corticoesteroides no ha dado el mismo resultado en todos los casos (Terpstra *et al.*, 1992). Hay que destacar también que los animales que nacen infectados pueden eliminar el virus durante periodos de tiempo muy largos de forma que centinelas puestos en contacto con ellos entre 64 y 112 días después del nacimiento se infectan en la primera semana (Benfield *et al.*, 1997). En función de estos resultados parece probable que existan subpoblaciones de cerdos persistentemente infectados en granjas con problemas crónicos de SRRP, los cuales no siempre son fáciles de identificar ya que, aunque normalmente son cerdos retrasados, en ocasiones pueden tener una apariencia normal. Este tipo de animales tienen una importancia epidemiológica grande al ser una fuente de infección para otros animales seronegativos, fundamentalmente cuando se mezclan después del destete.

También se sabe que el virus puede permanecer en poblaciones infectadas al menos durante seis meses después de que cesen los síntomas de la enfermedad, pero se cree que este fenómeno se debe a la infección de animales susceptibles que no se habían infectado antes. De hecho, los resultados obtenidos hasta la actualidad indican que la mayoría de las granjas permanecen persistentemente infectadas tras un brote agudo (Keffaber *et al.*, 1992; Loula, 1992; Ohlinger *et al.*, 1992a; Stevenson *et al.*, 1992; Terpstra *et al.*, 1992; Thacker, 1992; Yoon *et al.*, 1992a). Así, se ha demostrado que cerdos centinelas introducidos en una granja 4 meses después de la desaparición de la enfermedad en su forma clínica desarrollan sintomatología 1 día después de su introducción, presentando títulos de anticuerpos detectables a los 7 días de su entrada en la granja, lo cual demuestra la presencia de una forma subclínica de la enfermedad en la población estudiada (Bilodeau *et al.*, 1994).

Se han descrito al menos tres factores que pueden contribuir a que una granja permanezca infectada permanentemente:

1. Aunque la mayoría de las cerdas presentes en una granja en un brote agudo de la enfermedad seroconvierten, se ha demostrado que entre un 15% y un 25% pueden escapar a la infección en el primer momento (Terpstra *et al.*, 1992; Robert *et al.*, 1993) e infectarse meses más tarde, contribuyendo al mantenimiento de la circulación del virus. Además, la seroprevalencia va disminuyendo con el tiempo tras un brote. Así, cuatro meses después de la presentación clínica de la enfermedad, aproximadamente el 90% de las cerdas son seropositivas, sin embargo, al cabo de un año el porcentaje de cerdas seropositivas disminuye, llegando a ser solamente de un 30% al

cabo de dos años de la infección inicial (Loula, 1992).

2. Los cerdos en crecimiento pueden actuar como reservorio del virus e infectar a los lechones destetados cuando pierden la inmunidad maternal. En este sentido cabe destacar que se han observado viremias de hasta 4 semanas en lechones en crecimiento, de forma que pueden eliminar el virus potencialmente durante periodos de tiempo muy largos y que pueden existir animales persistentemente infectados cuando la infección se ha producido *in utero*, lo cual da lugar a la eliminación del virus al menos durante 112 días tras el nacimiento. Como consecuencia, los lechones destetados se infectan cuando desaparece la inmunidad maternal a la edad de 3 a 6 semanas (Joo y Dee, 1993; Albina *et al.*, 1994; Freese y Joo, 1994), al entrar en contacto los lechones recién destetados con el virus eliminado por lechones de más edad (Loula, 1992; Stevenson *et al.*, 1992; Thacker, 1992). Esto puede dar lugar a que, al mismo tiempo que disminuye la seroprevalencia en las madres de una granja, los cerdos en crecimiento se infecten y seroconviertan. Así, en granjas que han presentado problemas reproductivos con anterioridad, aunque no se pueda constatar que el virus circula en ese momento en las salas de gestación o partos, es posible detectarlo muchas veces en las lechoneras (Stevenson *et al.*, 1992). No es sorprendente por tanto que en los cerdos destetados sea frecuente aislar el virus cuando los animales tienen entre 6 y 12 semanas de vida y observar seroconversiones en este mismo periodo.

3. En la mayoría de las granjas se introducen periódicamente cerdas de renuevo que son normalmente susceptibles a la enfermedad de forma que se puede mantener la cadena de infección con la eliminación del virus extendiéndose hasta que llegue el lote siguiente.

Sin embargo, la existencia de subpoblaciones dentro de una granja, es decir, la convivencia de animales seronegativos, de animales con infecciones agudas y de animales con títulos de anticuerpos que van disminuyendo simultaneamente en una granja infectada de forma crónica hace pensar que la circulación del virus en estas granjas es limitada, quizá debido al poco contacto que existe entre las cerdas en los sistemas de producción actuales (Dee *et al.*, 1996b). De esta manera, se ha postulado que el que el virus continúe circulando en una granja depende fundamentalmente de las medidas de manejo y de la estructura de la misma (Keffaber *et al.*, 1992; Freese y Joo, 1994; Torrison *et al.*, 1994). A pesar de la posible circulación constante del virus en una granja, se han descrito pocos casos de nuevos brotes debidos a la excrección del virus por animales persistente o latentemente infectados (Potter, 1994; Paton y Drew, 1995). En este sentido hay que tener en cuenta que la circulación del virus entre los animales destetados se puede producir sin que exista un fallo reproductivo en las granjas (Stevenson *et al.*, 1993).

1.3.3. Mecanismos de transmisión

La enfermedad puede entrar en una granja por transmisión aerógena o por el traslado de animales infectados (Komijn *et al.*, 1991; Robertson, 1992a) y en este caso la transmisión puede ser por aerosoles o por contacto directo (Wensvoort *et al.*, 1991; Terpstra *et al.*, 1991).

La transmisión por la vía aerógena se ha descrito en un gran número de casos, especialmente en Europa y, aunque es difícil probarlo definitivamente, existen evidencias que indican que este tipo de transmisión juega un papel importante en la difusión del virus. Así, se ha descrito que las condiciones meteorológicas que tuvieron lugar durante la primera epidemia del virus en Alemania y Holanda a principios de 1991 eran idóneas para la transmisión por esta vía, con humedades relativas altas y la presencia de nubes que evitarían la dispersión vertical del virus, vientos suaves y sostenidos lo cual reduciría el potencial de dispersión horizontal y temperaturas bajas que aumentarían su supervivencia en el ambiente (Komijn *et al.*, 1991). En El Reino Unido también se ha sospechado una transmisión por la vía aerógena, tanto cuando apareció la enfermedad por primera vez, dado que no se habían realizado importaciones de animales procedentes de los países donde ya se había descrito la enfermedad, como posteriormente, una vez establecidas medidas de control y limitado el movimiento de animales procedentes de granjas infectadas, cuando se extendió localmente (Edwards *et al.*, 1992). Los brotes que han aparecido en Dinamarca también se han atribuido a una transmisión aerógena y, si este es el origen del virus en este país, implica que puede viajar hasta 20 km (Mortensen y Madsen, 1992). Sin embargo, sólo ha podido ser demostrada la transmisión en distancias de hasta 2 km. El riesgo de transmisión aumenta por tanto en las distancias cortas, al aumentar la densidad de los animales, siendo especialmente importante la proporción de animales de cebadero, al aumentar el tamaño de la granja y al aumentar la intensidad de la ventilación (Blaha y Büker, 1995).

En la transmisión aerógena es importante la capacidad de supervivencia del virus en el medio ambiente. Sin embargo, al ser un virus con envoltura, ésta no es muy grande. Aunque puede sobrevivir durante largos periodos de tiempo, incluso años, en tejidos congelados, su vida media a 21°C son 20 horas y a 4°C 50 horas si el pH es el óptimo. Sin embargo, la vida media del virus disminuye a pH más bajos de 5 ó mayores de 7.

Como ya se ha mencionado anteriormente, también es posible recuperarlo de canales de cerdos en el matadero después de 48 horas a 4°C (Bloemraad *et al.*, 1994), aunque se cree que la importancia epidemiológica de este hecho es muy baja, ya que los aislamientos en muestras de animales de matadero son esporádicos (Frey *et al.*, 1995). Utilizando una técnica de inmunohistoquímica, se ha podido detectar el virus en células musculares aisladas de animales

Introducción

sacrificados a los 7 días p.i. además de detectarse en los pulmones, las amígdalas y los ganglios linfáticos. Sin embargo a los 14 días p.i. sólo se ha podido detectar en los pulmones y las amígdalas, pero no en el tejido muscular. Tampoco ha sido posible detectarlo en muestras obtenidas de animales procedentes de granjas infectadas (Magar *et al.*, 1995b).

Los casos mejor documentados de transmisión de la enfermedad son los debidos al movimiento de animales enfermos (Varewyck, 1991; Dee, 1992; Edwards *et al.*, 1992; Gordon, 1992; Robertson, 1992b). Estos animales pueden transmitir la enfermedad por contacto hasta 14 semanas después de la inoculación experimental (Terpstra *et al.*, 1992) e incluso existe un caso de transmisión después de 99 días de la infección experimental (Zimmerman *et al.*, 1992). El virus se puede eliminar por distintas vías, siendo posible aislarlo de hisopos nasales, de la saliva, de la orina, de secreciones prepuciales y las heces de los animales infectados (Edwards *et al.*, 1992; Christianson *et al.*, 1993; Yoon *et al.*, 1993; Wills *et al.*, 1995b; Teuffert *et al.*, 1995) aunque el aislamiento a partir de las heces no siempre es posible (Rossow *et al.*, 1994a; Wills *et al.*, 1995b). Se ha descrito un periodo de eliminación del virus por las secreciones nasales y las heces similar a la duración de la viremia, aunque no es tan fácil aislar el virus de estas localizaciones como lo es de la sangre (Yoon *et al.*, 1993). Además, existen evidencias epidemiológicas y experimentales de que el virus se puede extender por el uso de la inseminación artificial si se utiliza semen obtenido en la fase aguda de la infección (Robertson, 1992b; Yaeger *et al.*, 1993) ya que es posible aislar el virus del semen de verracos infectados experimentalmente (Swenson *et al.*, 1994; Christopher-Hennings *et al.*, 1995a), aunque no siempre de forma continua (Swenson *et al.*, 1994b; Teuffert *et al.*, 1995).

Una vez que la infección aparece en una granja se extiende muy rápidamente. Así, en los primeros 18 meses de la aparición de la enfermedad en El Reino Unido, el 75% de las cerdas estudiadas habían seroconvertido en un periodo de 3 semanas desde el momento en que se había sospechado de su presencia en la granja. Terpstra *et al.* (1992) demostraron que aproximadamente el 90% de las cerdas seroconvertían en un plazo de 3 meses desde que la enfermedad aparecía por primera vez. Para los lechones destetados la fuente de infección más importante parecen ser los lechones de más edad con los que entran en contacto después del destete (Stevenson *et al.*, 1993, 1994; Dee y Joo, 1994a).

Otra forma importante de transmisión es la transmisión vertical, ya que el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria e infectar a los fetos en el utero lo que da lugar a la aparición de lechones que pueden ser virémicos, presentar anticuerpos frente al virus o ambas cosas en el momento del nacimiento (Terpstra *et al.*, 1991; Christianson *et al.*, 1992, 1993; Mengeling *et al.*, 1994).

Introducción

En cuanto al papel que puedan jugar los fomites, en un estudio experimental, el VSRRP sólo se ha podido aislar en el día 0 de muestras de alfalfa, viruta, paja, plástico, botas de agua y acero inoxidable mantenidas entre 25°C y 27°C. Sin embargo se puede aislar durante un periodo de 11 días en el agua de la canalización, de 9 días en agua de pozo y de 4 a 6 días en soluciones tamponadas. De la saliva, la orina y las heces sólo se ha podido aislar el día de la contaminación. Estos resultados indican que es un virus muy lábil en el ambiente y que la única fuente de contaminación a tener en cuenta sería la contaminación del agua de bebida por los animales que estén eliminando el virus (Pirtle *et al.*, 1996).

No se conoce ninguna otra especie animal susceptible a la infección por este virus ni se ha podido demostrar que las ratas o los ratones actúen como reservorio (Hooper *et al.*, 1994). Sin embargo, los datos obtenidos por Zimmermann *et al.* (1993) parecen indicar que ciertas aves migratorias pueden ser infectadas, eliminando el virus por las heces entre los días 5 y 24 p.i., actuando por tanto como vectores, y llevando la enfermedad a zonas muy distantes del foco inicial de infección. Tampoco se han descrito casos de infecciones por este virus en personas relacionadas de alguna manera con los cerdos y no se ha podido demostrar que se produzca seroconversión en personas que manejan el virus en el laboratorio (Paton, 1995).

1.3.4. Factores de riesgo

Distintos autores han estudiado los factores de riesgo asociados a la presentación de la enfermedad (Fiedler, 1991; Vogel *et al.*, 1991; Bane *et al.*, 1992; Edwards *et al.*, 1992; Blaha y Búker, 1995). Los que han demostrado tener alguna importancia en la presentación de la enfermedad son los siguientes :

1. La adquisición de animales. En un estudio realizado en El Reino Unido se demostró que las granjas seropositivas habían introducido una media de 100 cerdas de reposición, mientras que las seronegativas sólo habían introducido una media de 27. En un estudio llevado a cabo recientemente en Dinamarca sólo se ha podido asociar la entrada de la enfermedad en las granjas con la entrada de animales de reposición procedentes de granjas positivas y con la compra de lechones de 25 kg para cebarlos (Mousing *et al.*, 1995).
2. El no respetar los periodos de cuarentena cuando se introducen nuevos animales en una granja. En el estudio anteriormente mencionado se puso de manifiesto que sólo 12 de las 32 granjas infectadas habían respetado un periodo de cuarentena, mientras que en el caso de las granjas seronegativas, lo habían respetado 9 de las 11 estudiadas.
3. La proximidad de la granja a otras granjas infectadas.
4. El tamaño de la granja. Granjas de más de 50 cerdas tienen más probabilidades de infectarse.

Introducción

5. El tipo de construcción. Las granjas que tienen todas sus dependencias en un sólo edificio presentan una mayor incidencia de la enfermedad.
6. El tipo de suelo. Las granjas con suelo de rejilla presentan mayor riesgo de infección por este virus.
7. El tipo de almacenamiento de purines. El riesgo aumenta si se almacenan los purines en fosas bajo los animales.
8. La entrada de camiones y otros vehículos. La entrada de vehículos a la granja, como sucede con todas las enfermedades infecciosas, aumenta el riesgo de infección.
9. La limpieza y desinfección de los locales. Éstos deben limpiarse y desinfectarse cada vez que se vacíen, ya que la falta de higiene hace más probable tanto la entrada como el mantenimiento de la enfermedad.
10. Medidas de manejo. Un buen sistema de manejo, unido a la limpieza sistemática de los locales disminuye la gravedad de la sintomatología, cuando la enfermedad está presente en una granja.
11. Tipo de explotación. Se ha observado que la incidencia de la enfermedad es mayor en granjas en las que los animales están confinados que en los sistemas extensivos.
12. La presencia de micotoxinas en el pienso. Parecer ser que la presencia de fumonisina aumenta el riesgo de presentación de la enfermedad, ya que por sí misma es capaz de producir edema de pulmón.
13. La presencia de ratas y ratones en la granja.

En cuanto a la posibilidad de que la enfermedad resulte endémica en una granja, un trabajo llevado recientemente a cabo en EE.UU. utilizando modelos logísticos para identificar los factores de riesgo indica que las variables que aumentan las probabilidades de que una granja se infecte endémicamente son:

1. Que la granja se haga su propia reposición.
2. Que las salas de partos tengan un número de jaulas que oscile entre 10 y 20.
3. Que la población de la granja esté envejecida.
4. Que el tamaño de la granja esté comprendido entre 101 y 500 cerdas (Baysinger *et al.*, 1997).

1.4. IMPORTANCIA ECONÓMICA

Las pérdidas producidas por la enfermedad son muy variables, tanto en extensión como en duración y es importante distinguir entre aquellas producidas en la forma epidémica de la enfermedad y las producidas cuando es endémica.

En los casos más agudos, las pérdidas económicas se deben, fundamentalmente, a un

aumento de la mortalidad en lactación y a un descenso en el número de lechones nacidos vivos, con trabajos concretos señalando unas pérdidas de entre 1 y 2,5 cerdos cebados por cerda y año (Blackburn, 1991; Mortensen y Madsen, 1992; Brouwer *et al.*, 1994) y de entre un 0% y un 20% en la producción anual (van Alstine, 1991; Lindhaus y Lindhaus, 1991; Raymarkers, 1991; Zimmerman y Johnson, 1991). También se ha descrito un aumento en el intervalo entre partos, el cual va asociado a un aumento en el número de días no productivos y a un aumento en la tasa de renovación (Brouwer *et al.*, 1994). Sin embargo, las compensaciones de precios en el mercado, debido a la falta de animales, hacen muy difícil la valoración de las pérdidas económicas debidas a la infección por el VSRRP (Raymarkers, 1991).

Por el contrario, en los casos crónicos de la enfermedad las principales pérdidas económicas se derivan de la importancia que adquieren las infecciones secundarias en los animales en crecimiento y en cebo, responsables de los casos de rinitis y neumonía observados con frecuencia en el campo y de la consecuente reducción en la tasa de crecimiento, con un aumento en la tasa de conversión y una disminución en la ganancia media diaria de peso que puede sufrir una reducción de entre un 15% y un 50% según los distintos autores, lo cual trae como consecuencia un aumento en el número de días de permanencia de los animales en la granja y en el número de cerdos de bajo peso que van al matadero (Dial *et al.*, 1990; Moore *et al.*, 1990; van Alstine, 1991; Loula, 1991; Keffaber *et al.*, 1992; Dee, 1996a). Además, hay que tener en cuenta las pérdidas producidas por el aumento en la tasa de mortalidad que se observa, la cual puede oscilar entre un 10% y un 25% después del destete, aunque lo normal es que se presenten cifras del doble de la mortalidad que había antes de aparecer el SRRP (Moore *et al.*, 1990; Keffaber *et al.*, 1992). Este aumento en la tasa de mortalidad va acompañado de un gasto excesivo en medicación por cada cerdo producido, el cual puede aumentar entre el 50% y el 100% (Kertaert *et al.*, 1994; Dee, 1996a).

1.5. PATOGENIA

1.5.1. Distribución orgánica del virus

No se conoce con exactitud cuál es el mecanismo por el cual el VSRRP es capaz de producir su acción patógena. Los datos disponibles en la actualidad proceden de observaciones clínicas y de la reproducción experimental de la enfermedad.

Son susceptibles al VSRRP cerdos de todas las edades, que no hayan estado previamente en contacto con el agente causal, cuando son inoculados por las vías oral, oronasal, intramuscular, intravenosa, intraperitoneal ó intrauterina (Christianson *et al.*, 1992, 1993; Collins *et al.*, 1992b;

Introducción

Yaeger *et al.*, 1993; Rossow *et al.*, 1994a, 1995; Swenson *et al.*, 1994a, 1995a; Gradil *et al.*, 1996). El periodo de incubación es variable, pero en los animales inoculados experimentalmente los síntomas de la enfermedad aparecen normalmente entre los días 2 y 7 p.i. (Terpstra *et al.*, 1991; Wensvoort *et al.*, 1991; Christianson *et al.*, 1992; Plana *et al.*, 1992b; Rossow *et al.*, 1994a, 1995; Halbur *et al.*, 1995a). Sin embargo, este periodo es diferente cuando lo que se considera es una granja y no los animales de forma individual. Así, en la epidemia de Gran Bretaña, se estimó que el intervalo de tiempo transcurrido entre la introducción de animales infectados en una granja seronegativa y la aparición de los primeros síntomas oscilaba entre 14 y 37 días, en Bélgica entre 10 y 18 días y en EE.UU. entre 3 y 24 días (Meredith, 1995). Las diferencias observadas en el periodo de incubación pueden reflejar, por un lado, diferencias en la patogenicidad de las cepas estudiadas y por otro, diferencias en cuanto a la vía de exposición, las condiciones de producción, etc. Es de destacar además, que el tiempo transcurrido entre el momento de contacto con el virus y la aparición de los primeros síntomas depende del tipo de sintomatología que consideremos y de los grupos de edad. Así, los síntomas inespecíficos y los respiratorios, que se presentan principalmente en animales jóvenes, aunque pueden afectar a animales de todos los grupos de edad, son los primeros que se manifiestan y los problemas asociados a la reproducción aparecen unas dos semanas más tarde. De esta forma, mientras que el periodo de incubación hasta la aparición de los signos de anorexia y de la fiebre puede oscilar entre 3 y 5 días, las anomalías en el parto y el aumento en la mortalidad de los neonatos no se producen hasta entre 14 y 28 días más tarde (Loula, 1991).

La vía de penetración del virus es la oronasal y desde aquí se dirige a sus células diana que parecen ser, según se ha detectado por técnicas de inmunohistoquímica (IHQ), primariamente los macrófagos y también los monocitos y las células dendríticas, que son células presentadoras de antígenos y especialmente ricas en la glicoproteína del complejo mayor de histocompatibilidad de clase II (Halbur *et al.*, 1996). Esta teoría parece confirmarse por el hecho de que a las 12 horas p.i. el virus se puede detectar mediante técnicas de IHQ en células del epitelio bronquial, en células del endotelio arteriolar, en monocitos y en macrófagos intersticiales, intravasculares y alveolares cuando se realizan cortes de pulmón, además de detectarse en macrófagos del epitelio de la mucosa nasal y de las amígdalas (Rossow *et al.*, 1996a). La replicación del virus es muy rápida. Se han detectado, en estudios realizados *in vitro*, antígenos víricos en el citoplasma de las células infectadas a partir de las 6 horas p.i. y a las 9 horas p.i. aparecen las primeras partículas víricas ensambladas (Pol y Wagenaar, 1995), liberándose la primera progenie de virus entre las 9 y las 12 horas p.i. (Pol *et al.*, 1992).

Por otro lado, aunque a las 12 horas p.i. el virus se puede detectar en los tipos celulares anteriormente mencionados, parece ser que la primera replicación del virus se produce en los MAP,

Introducción

aunque existe cierta controversia en este asunto ya que ciertos autores opinan que ésta se podría producir en el epitelio nasal y bronquial (Pol *et al.*, 1991), explicando de este modo las lesiones de degeneración de ambas mucosas observadas en los casos de SRRP. Desde los MAP, el virus se disemina por el resto del organismo, por la vía hematológica y posiblemente linfática. Como consecuencia, es posible detectarlo de forma bastante constante en los órganos linfoides y en la sangre tras la infección. En esta última localización se puede encontrar tanto en su forma libre, como lo demuestra el hecho de que sea posible aislarlo del suero de los animales virémicos, como ligado a los leucocitos o monocitos circulantes, pudiéndose aislar de la serie blanca a partir del día 1 p.i. (Rossow *et al.*, 1994a). Esta última localización es previsible al haberse demostrado, en estudios realizados *in vitro*, que el virus es capaz de infectar a los monocitos circulantes (Voicu *et al.*, 1994). Este fenómeno explicaría la leucopenia que se ha asociado a la enfermedad, habiéndose descrito una reducción de hasta un 30% en los leucocitos circulantes durante la fase aguda de la infección.

La duración de la viremia es bastante prolongada, siendo posible detectar el virus desde las 12 horas p.i. (Rossow *et al.*, 1995) hasta incluso el día 63 p.i. (Vézina *et al.*, 1996), aunque el periodo medio es de 28 días. Hay que destacar que la presencia de anticuerpos circulantes, que aparecen hacia el día 7 p.i. no evita la viremia, demostrándose que el virus permanece tanto en la circulación como en distintos órganos, aún en presencia de los mismos (Rossow *et al.*, 1994a).

A pesar de la larga duración de la viremia no se ha determinado de forma concluyente si los animales infectados pueden actuar como portadores o no. Sin embargo, se sabe que la aplicación de corticoesteroides exógenos hace que animales infectados 16 semanas antes vuelvan a eliminar el virus, como ha quedado demostrado por la infección de animales seronegativos que convivían con ellos (Albina *et al.*, 1994). Por otra parte, se ha podido recuperar el virus de la orofaringe de un animal a los 157 días p.i. (Wills *et al.*, 1995a) e incluso a los 210 días de vida en el caso de un animal infectado *in utero* (Benfield *et al.*, 1997). Todos estos datos parecen apuntar a una persistencia de la infección con el VSRRP, aunque serán necesarios estudios más amplios para poder afirmarlo definitivamente.

El proceso de diseminación por la vía hematológica es bastante rápido y permite que el virus llegue a distintas localizaciones. Como consecuencia se ha detectado en la mucosa nasal, el pulmón, el corazón, los ganglios linfáticos, el timo, el bazo, el intestino, el hígado, las glándulas adrenales, las amígdalas, el cerebro y la médula ósea, encontrándose fundamentalmente en los macrófagos presentes en estas localizaciones.

En el epitelio de la mucosa nasal aparece a partir de las 12 horas p.i., pudiendo detectarse

Introducción

posteriormente hasta el día 21 p.i., aunque no de forma constante. El virus se localiza fundamentalmente en los macrófagos que se encuentran en la mucosa y la submucosa y, con menor frecuencia, en las glándulas serosas del epitelio (Halbur *et al.*, 1996; Rossow *et al.*, 1996a), habiéndose comprobado que las zonas donde se encuentra corresponden a zonas de inflamación. El virus se ha detectado también en células del epitelio bronquial (Pol *et al.*, 1991) y se ha observado que produce una destrucción específica del epitelio traqueal en cultivos de anillos traqueales (Park *et al.*, 1996a).

En el pulmón, órgano preferente para la localización del virus, se puede detectar desde el día 1 hasta por los menos el día 28 p.i., siendo los lóbulos anterior y medio los más afectados (Halbur *et al.*, 1996). En los primeros momentos de la infección, el virus se puede determinar por técnicas de inmunohistoquímica en las células epiteliales de los bronquiolos, en las células endoteliales de las arteriolas, en las células mononucleares de los septos alveolares y en los macrófagos intersticiales, intravasculares y alveolares, pero a partir del día 3 p.i. se detecta fundamentalmente en los macrófagos intersticiales y sobre todo en los alveolares. Sin embargo, por técnicas de IHQ se ha observado que la tinción es más intensa entre los días 14 y 21 p.i. en las células endoteliales, los monocitos y los macrófagos alveolares, intersticiales e intravasculares (Halbur *et al.*, 1996; Rossow *et al.*, 1996a). Por otra parte, MAP obtenidos en lavados pulmonares pueden ser positivos al VSRRP hasta el día 70 p.i. (Mengeling *et al.*, 1996c). Además de en las localizaciones anteriormente mencionadas, el virus se ha detectado, de forma aislada, en algunos neumocitos tipo II, pero no se ha podido confirmar la replicación del virus en los mismos (Halbur *et al.*, 1996).

Por otra parte, se ha observado que tanto los MAP como los macrófagos intersticiales pulmonares se tiñen cuando se realizan tinciones para detectar IgGs, indicando que los anticuerpos frente al VSRRP pueden jugar un papel específico en el desarrollo de las lesiones pulmonares. Apoya esta teoría el hecho de que las lesiones pulmonares causadas por el VSRRP sean más graves y los títulos víricos en el pulmón más altos cuando el título de anticuerpos frente al virus detectado por IFI alcanza su pico máximo tras la infección (Rossow *et al.*, 1996). Este hecho, unido a la incapacidad de los anticuerpos para neutralizar el virus en cultivos de macrófagos alveolares, ha hecho que se considere probable que los anticuerpos faciliten la infección de los mismos mediante la formación de inmunocomplejos que se unirían a los macrófagos mediante la fracción Fc de las inmunoglobulinas.

La distribución de las lesiones pulmonares es multifocal, indicando que se desarrollan después de la viremia, ya que, en caso contrario, seguirían una distribución bronquiolar.

Introducción

Otra de las localizaciones preferentes del VSRRP son los ganglios linfáticos. En ellos, las células que son positivas con mayor intensidad son las células de los centros germinales que presentan hiperplasia y necrosis focal, las cuales son mayoritariamente macrófagos o células dendríticas y estando en muchos casos vacuolizadas e inflamadas. El antígeno se detecta con mucha menor frecuencia en macrófagos del tejido linfóide perifolicular y en las trabéculas de tejido conectivo. En esta localización se puede encontrar, al menos, entre los días 1 y 28 p.i., detectándose la mayor cantidad entre los días 2 y 7 p.i. (Halbur *et al.*, 1996), aunque las lesiones de necrosis y de hipertrofia e hiperplasia de los centros germinales son más frecuentes y marcadas entre los días 14 y 21 p.i. (Rossow *et al.*, 1995), variando en intensidad y distribución. La multiplicación del virus en los ganglios linfáticos podría explicar, por su liberación constante al torrente circulatorio, la existencia de una viremia tan prolongada (Rossow *et al.*, 1995).

Otro órgano linfóide donde también se detecta de forma bastante constante el virus son las amígdalas, encontrándose en esta localización desde el día 1 hasta al menos el día 28 p.i.. La distribución del antígeno es dispersa pero aparece con mayor frecuencia en el epitelio de las criptas y en sus alrededores y también dentro de los folículos. En el epitelio de las criptas aparece fundamentalmente en células que pueden ser macrófagos o células epiteliales y lo mismo sucede en los folículos linfoides hiperplásicos y en el tejido reticular hipertrófico donde se encuentra en células con apariencia de macrófagos o células dendríticas. Las células infectadas son muy positivas, pero sin embargo son escasas (Halbur *et al.*, 1996).

El virus se detecta también en el timo, donde las células positivas están con mayor frecuencia en la médula y se asemejan fundamentalmente a los macrófagos y en menor medida a células interdigitales. Además, en la corteza se observan algunos macrófagos positivos. En esta localización se puede detectar el virus entre los días 2 y 21 p.i.. Se ha especulado que la presencia y multiplicación del virus en las células del timo podría dar lugar a fenómenos de inmunotolerancia (Halbur *et al.*, 1996).

En el bazo, órgano donde también se ha encontrado el virus, las células positivas se encuentran normalmente en la pulpa blanca y son macrófagos y células dendríticas de los folículos, y, con menor frecuencia, son positivos también los macrófagos y las células reticulares de la zona marginal. En esta localización se puede encontrar el virus, de forma no constante, entre los días 1 y 28 p.i. (Halbur *et al.*, 1996).

El antígeno vírico aparece también en el ileon, fundamentalmente en los macrófagos y las células dendríticas de las placas de Peyer, aunque también se observan algunos macrófagos positivos en la lámina propia y en las vellosidades intestinales. El virus puede encontrarse en esta

Introducción

localización entre los días 1 y 21 p.i., pero su presencia es mucho más constante entre los días 2 y 5 p.i. (Halbur *et al.*, 1996).

En el corazón se puede detectar el antígeno entre el día 3 y el día 21 p.i. y, en cualquier caso, su presencia es escasa y se encuentra bastante diseminado, apareciendo en macrófagos dispersos en el miocardio, en linfocitos T y B que rodean a los vasos sanguíneos y en células endoteliales de pequeños capilares o vasos linfáticos (Halbur *et al.*, 1996, Rossow *et al.*, 1996a). Su presencia se asocia con focos de miocarditis caracterizada por una necrosis de las células del miocardio, con un acúmulo de macrófagos y linfocitos en la zona subendocardial, en el intersticio del miocardio y en los espacios perivasculares (Rossow *et al.*, 1995). Esta miocarditis observada podría ser consecuencia de una reacción autoinmune porque la cantidad de antígeno que se encuentra en esta localización no la justifica (Rossow *et al.*, 1996a). Además, es una lesión de presentación tardía, apareciendo de forma constante a partir del día 21 p.i. (Rossow *et al.*, 1995) cuando ya han aparecido los anticuerpos, lo cual apoyaría esta teoría.

Además de las localizaciones anteriormente descritas, existen otras donde también es posible encontrar el virus, aunque de forma esporádica. Entre ellas destaca el hígado, donde se puede detectar entre los días 2 y 7 p.i., asociado a las células de Kupffer y a los macrófagos de los sinusoides, el riñón donde se encuentra de forma esporádica en células con aspecto de macrófagos en la médula renal y en el intersticio pélvico entre los días 3 y 7 p.i., las glándulas adrenales, donde se localiza en los macrófagos entre los días 3 y 10 p.i. (Halbur *et al.*, 1996) y el cerebro, el cerebelo y el tallo cerebral en el día 7 p.i. (Shin *et al.*, 1996a). En el cerebro se ha identificado en los macrófagos del plexo coroideo y adyacentes a arteriolas también en el día 14 p.i. (Rossow *et al.*, 1996a). En esta última localización se ha descrito una inflamación perivascular, aunque no está claro si es específica o responde a la vasculitis general, descrita también en otros tejidos. La vasculitis varía en intensidad y gravedad y se asocia a la reacción inflamatoria perivascular que aparece en distintos órganos (Rossow *et al.*, 1995). Esta lesión podría dar lugar a un aumento de la permeabilidad del endotelio de forma local, dando lugar a la aparición de los edemas que se han asociado al SRRP, aunque éstos también podrían ser consecuencia de un aumento de la presión linfática eferente secundaria a una linfadenopatía local.

La presencia del virus en las localizaciones hasta aquí descritas y los fenómenos inflamatorios que la acompañan explican la mayoría de las lesiones observadas en los animales infectados.

Sin embargo, la patogenia de la enfermedad respiratoria se debe fundamentalmente, junto a una destrucción del sistema mucociliar producida como consecuencia de la rinitis que ocasiona la

presencia del virus en la mucosa nasal y que facilita la invasión de agentes secundarios al comprometer una de las barreras de defensa del sistema respiratorio, a la destrucción de los MAP que se produce, la cual puede oscilar entre un 50% y un 65% en un plazo de 7 días p.i. (Molitor *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1992; Molitor, 1993). Esta reducción es evidente en la proporción de MAP recuperados en los lavados pulmonares que, si bien normalmente constituyen el 95% de las células recuperadas, tras la infección solamente alcanza el 50%. Además, se altera la capacidad de liberación del anión superóxido y se suprime el NADPH en los macrófagos infectados con lo cual se compromete uno de los principales componentes de la respuesta pulmonar. Esta alteración no se prolonga en el tiempo ya que en el día 28 p.i. los macrófagos pulmonares han vuelto a recuperar su funcionalidad (Molitor, 1993). Además se ha especulado que los macrófagos activados y en proceso de degeneración pueden liberar interleukinas que podrían mediar los cambios inflamatorios observados en el pulmón. Así, la presencia de antígenos víricos en el pulmón normalmente se asocia a fenómenos de inflamación, con un engrosamiento de los septos alveolares y un gran número de macrófagos y detritus celulares en la luz de los alveolos que se encuentran parcialmente ocluidos por neumocitos tipo II hipertrofiados e hiperplásicos. El aumento de las células intersticiales en el pulmón puede contribuir al mal funcionamiento pulmonar, dando lugar a la aparición de disnea y al eritema cutáneo. De esta manera, el mecanismo de defensa respiratorio puede aparecer disminuido durante un periodo de hasta 4 semanas, momento en que la respuesta inmune ya está perfectamente desarrollada (Done y Paton, 1995). Las lesiones pulmonares aparecen el día 3 p.i., persistiendo hasta, al menos, el día 21 p.i. (Rossow *et al.*, 1995).

1.5.2. Efecto del VSRRP en los verracos

Los verracos infectados con el VSRRP pueden desarrollar los signos clínicos asociados normalmente a la enfermedad aunque, en ocasiones, presentan una infección subclínica que no da lugar a la aparición de ningún síntoma. Así, en un estudio realizado en cinco centros de inseminación artificial infectados se comprobó que sólo el 25% de los animales presentaban sintomatología (Feitsma *et al.*, 1992). Cuando aparecen síntomas, éstos suelen tener una duración muy corta, oscilando entre 1 y 3 días. En concreto se han observado depresión y anorexia (Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1994b), fiebre que puede durar las dos primeras semanas p.i. (Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1994a; Christopher-Hennings *et al.*, 1995a), signos respiratorios caracterizados por la aparición de estornudos y tos durante 1 día después de la inoculación (Swenson *et al.*, 1994a) y pérdida de la libido (Feitsma *et al.*, 1992; Hopper *et al.*, 1992). La viremia en la mayoría de los verracos dura entre 9 y 21 días, habiéndose detectado viremias de hasta 31 días (Swenson *et al.*, 1994a; Christopher-Hennings *et al.*, 1995a).

Por otra parte, en distintos centros de inseminación se han detectado alteraciones en la

Introducción

calidad espermática de los verracos infectados (de Jong *et al.*, 1991a; Feistma *et al.*, 1992). Estos cambios parecen empezar dos semanas después de la infección e incluyen reducciones en la motilidad, un aumento en el número de acrosomas anormales y aumentos en las alteraciones morfológicas, fundamentalmente en la morfología de las cabezas. Estas alteraciones hacen que el número de eyaculados que son rechazados en los centros de inseminación aumente de un 2% a un 12%, habiéndose descrito una reducción en el número de dosis que se obtienen diariamente 4 semanas después de la infección, para volver a los niveles normales 7 semanas después (Feitsma *et al.*, 1992). Sin embargo, los estudios experimentales que se han llevado a cabo con cepas virulentas no han conseguido aclarar este punto, obteniéndose resultados que no son definitivos. Así, en algunos trabajos, sólo se han observado reducciones en el volumen del eyaculado y cambios en el pH del semen, que no han sido atribuidos a la infección por el virus, sino a cambios en el esquema de alimentación de los animales, ya que empezaron 1 semana antes de la inoculación (Swenson *et al.*, 1994a). Sin embargo, en otros trabajos se han observado estas disminuciones acompañadas de un aumento en la concentración que puede durar hasta el día 14 p.i. (Yaeger *et al.*, 1993) o no, observándose una disminución en el volumen, sin cambios aparentes en la concentración entre los días 9 y 29 p.i. (Shin *et al.*, 1995). Por el contrario, otros autores han encontrado diversas alteraciones entre los días 25 y 35 p.i. (Teuffert *et al.*, 1995). También en un estudio llevado a cabo para valorar el efecto de la vacunación con una vacuna viva (Prime Pac PRRS®, Schering Plough Animal Health) se pudo observar una disminución de un 35% en el porcentaje de espermatozoides con movimiento progresivo en el grupo de los testigos tras la contraprueba, aunque esta disminución fue de sólo un 5% en el grupo de verracos previamente vacunados, sin que el virus vacunal hubiera causado previamente ninguna alteración (Hutchinson *et al.*, 1997). Un estudio similar llevado a cabo con otra vacuna viva modificada (RespPRRS®, Boehringer Ingelheim Vetmedica) ha dado lugar a resultados contradictorios ya que mientras algunos autores han encontrado alteraciones en la calidad espermática tras la vacunación, consistentes fundamentalmente en disminuciones de la motilidad progresiva y un aumento de las morfoanomalías, debido principalmente a un aumento en las gotas citoplasmáticas proximales, seguido de un aumento en las gotas citoplasmáticas distales y de una reflexión de la pieza intermedia (Christopher-Hennings *et al.*, 1996b), otros autores no han encontrado ninguna alteración tras la vacunación (Nielsen *et al.*, 1995; Shin *et al.*, 1995).

Además de su efecto en la calidad espermática, el hecho de que el VSRRP pertenezca a la familia *Arteriviridae*, cuyos miembros se caracterizan por su predilección por los macrófagos y el aparato reproductor masculino, ha levantado la sospecha de que este virus pueda persistir en esta localización y eliminarse con el semen, como se ha demostrado con el VAE que puede persistir en los testículos de los sementales, eliminándose por el semen durante largos periodos de tiempo (Timoney *et al.*, 1986). La posibilidad de que el VSRRP se elimine en el semen plantea el riesgo de

Introducción

la introducción del SRRP en una granja negativa debido a la compra de verracos que eliminan el virus o al uso de la inseminación artificial. De hecho, en algunas epidemias ésta ha sido la causa más probable de entrada del virus en algunas explotaciones (Robertson, 1992; Yaeger *et al.*, 1993). Como consecuencia de lo anteriormente expuesto, se han realizado diversos estudios experimentales para determinar si es posible o no la eliminación del virus por esta vía y, si es así, estudiar la duración de la misma. En ellos se ha demostrado que el virus puede ser eliminado por el semen a partir del día 3 p.i., aunque en ocasiones de forma intermitente y con una extensión bastante prolongada en el tiempo, con un periodo medio de eliminación de virus de unos 39 días. Así, utilizando una técnica de transcripción inversa y reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) y un bioensayo, el VSRRP ha sido detectado en el semen a partir del día 3 p.i. y ha permanecido en el mismo, bien sea de forma constante o intermitente, durante periodos de tiempo variables de forma que la última detección positiva osciló entre los días 25 y 92 p.i., aunque en los últimos días no existe buena correlación entre la detección por la técnica de RT-PCR y los resultados del bioensayo, detectándose virus infectivo por última vez el día 67 p.i. (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a). La discrepancia entre ambos métodos de detección se puede deber a dos posibilidades. Una de ellas sería que el virus ya no es infectivo a partir del día 67 p.i. y la otra es que esté presente en cantidades demasiado bajas para poder producir una infección en los lechones inoculados. En otro trabajo realizado utilizando 4 verracos se detectó virus infectivo desde el día 3 p.i. hasta los días 13, 25, 35 y 47 p.i. respectivamente, pero no más tarde (Swenson *et al.*, 1994a). Sin embargo, la eliminación del virus en el semen no siempre ha podido ser demostrada durante periodos de tiempo tan prolongados, detectándose excepcionalmente en otros estudios en los días 7 y 8 p.i. (Swenson *et al.*, 1994b) o en el día 14 p.i. (Teuffert *et al.*, 1995).

Hay que destacar que incluso animales vacunados con una vacuna atenuada e inoculados con una cepa virulenta a las 2 semanas de la segunda dosis de la vacuna han demostrado eliminar el virus desde la primera extracción de semen tras la inoculación (en el día 4 p.i.), oscilando el tiempo de eliminación, entre 4 y 28 días, periodo que sin embargo ha sido menor que en los testigos no vacunados (Swenson *et al.*, 1995b). En este estudio se observó que los animales que mostraron anticuerpos, aunque sólo detectados por inmunoblotting, como respuesta a la vacunación, eliminaron el virus durante periodos de tiempo más cortos. Por otra parte, en pruebas realizadas con la vacuna viva modificada RespPRRS®, aunque algunos autores no han podido detectar el virus en el semen de los animales vacunados (Nielsen *et al.*, 1995), otros sí lo han hecho durante periodos de tiempo variables entre los días 6 y 39 post-vacunación (Molitor y Shin, 1995; Christopher-Hennings *et al.*, 1996b), aunque la cantidad de virus excretada fue muy baja (Molitor y Shin, 1995). En cuanto a la capacidad de la vacuna para evitar la eliminación del virus virulento por el semen existe controversia ya que, mientras en algunos estudios no se detecta el virus después de la inoculación con una cepa virulenta (Molitor y Shin, 1995; Shin *et al.*, 1996), en

Introducción

otros se ha detectado, aunque durante periodos de tiempo más cortos que en los testigos, eliminándose en el semen entre los días 4 y 24 después de la contraprueba (Nielsen *et al.*, 1995; Christopher-Hennings *et al.*, 1996b). Lo que sí ha quedado demostrado es una reducción en la duración de la viremia tras la inoculación con una cepa virulenta. Por otra parte, se ha determinado que la exposición previa al VSRRP evita la infección y eliminación de virus por el semen subsecuente a una inoculación homóloga (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a).

Es importante tener en cuenta que el virus se ha podido detectar en el semen aunque no exista viremia y sí anticuerpos neutralizantes, lo cual ha demostrado que ni la determinación de la viremia ni la presencia de anticuerpos son indicadores de la posibilidad de encontrar el virus en el semen de los animales infectados (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a; Swenson *et al.*, 1995b). Sin embargo, hasta la actualidad no se ha podido demostrar la infección persistente en ningún trabajo, aunque tampoco se puede descartar totalmente esta posibilidad, al menos si se compara el VSRRP con el VAE, el cual puede eliminarse con el semen durante periodos de hasta 2 años tras la infección del semental (Timoney *et al.*, 1986). En el caso del VSRRP la eliminación más larga descrita, como ya se ha mencionado, es de 92 días, detectándose el virus en las glándulas bulbouretrales de este mismo verraco en el momento del sacrificio en el día 101 p.i. (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a).

Cuando se ha intentado determinar en qué fracción del semen va vehiculado el virus algunos autores han observado que no se puede detectar de forma fiable en la fracción del plasma seminal y sí en la fracción celular (van Woensel *et al.*, 1994; Christopher-Hennings *et al.*, 1995b). Sin embargo, el semen obtenido de verracos vasectomizados ha demostrado contener virus, lo cual indicaría que también se puede asociar a la fracción no espermática del semen (Christopher-Hennings *et al.*, 1995c). Además es posible encontrar el ARN del virus no sólo en el semen completo, sino también en el plasma seminal y, en la fracción celular, unido a células no espermáticas y a las colas de los espermatozoides o en el semen completo, indicando que el virus se puede encontrar tanto en la forma libre como asociado a células (Molitor y Shin, 1995).

Además de con su localización, también se ha especulado con el origen que tiene el virus que se elimina en el semen. Algunos autores opinan que podría aparecer como consecuencia de la contaminación de este semen con células sanguíneas (Ohlinger, 1992b). Sin embargo, el virus se puede detectar en esta localización después de que desaparezca la viremia (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a), indicando que debe existir otro lugar de replicación vírica que sea el origen del virus eliminado. Su presencia en el semen asociado a células con morfología similar a macrófagos parece indicar que se encuentra en los macrófagos seminales, a los que llegaría como consecuencia de su replicación en los ganglios linfáticos y su diseminación a través de los monocitos y los

Introducción

macrófagos. Esta teoría se apoya en el hecho de que cuando se ha intentado aislar el virus de los distintos componentes del aparato genital, para ver si alguna de estas localizaciones podría servir de soporte para la replicación del virus se ha visto que normalmente los órganos del aparato reproductor estudiados son negativos (Ohlinger, 1992b; Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1994a), habiéndose aislado sólo de forma esporádica de algunos de ellos, como ha sido el caso de su detección en el día 101 p.i. en una glándula bulbouretral de un verraco que eliminó el virus durante 92 días después de su inoculación experimental (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a). Sin embargo, cuando se han empleado técnicas de hibridación *in situ* se han observado señales positivas en muestras de testículos, en los espacios intersticiales que rodean a los vasos sanguíneos que se encuentran entre los túbulos seminíferos, y también en muestras de epidídimo, en las cuales aparecían células positivas con morfología diferente a la de los espermatozoides en la luz de los túbulos, en las muestras de próstata y en las muestras de glándulas bulbouretrales (Shin *et al.*, 1996a).

Por otra parte, hay que tener en cuenta que la eliminación del virus por el semen plantea la posibilidad de la transmisión venerea de la enfermedad. En la actualidad esta posibilidad está aceptada. Sin embargo, existe una cierta controversia ya que, aunque en algunos trabajos se ha conseguido transmitir el virus (Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1995a; Gradil *et al.*, 1996; Lager *et al.*, 1996b), en otros no ha sido así (Swenson *et al.*, 1994b; Teuffert *et al.*, 1995). Así, 6 cerdas inseminadas con semen obtenido en los días 4, 8 y 12 p.i. no seroconvirtieron al virus y parieron lechones sanos (Teuffert *et al.*, 1995) y 5 cerdas inseminadas con semen obtenido de verracos infectados experimentalmente en los días del 7 al 9 p.i. permanecieron clínicamente normales durante todo el periodo de estudio, sin que fuera posible aislar el virus ni de las muestras de sangre obtenidas ni del aparato reproductor recogido en el momento de la necropsia el día 34 post-inseminación. Además no seroconvirtieron durante el tiempo que duró el estudio, aunque el semen obtenido en los días 7 y 8 p.i. contenía el virus, como quedó demostrado en un bioensayo realizado con el mismo (Swenson *et al.*, 1994b). Por otro lado, en un estudio llevado a cabo por Gradil *et al.* (1996) los resultados han sido variables, ya que mientras 8 de 10 cerdas a las que se les había sincronizado el celo y habían sido inseminadas con semen obtenido en los días 4, 5, 7 y 8 p.i. seroconvirtieron al VSRRP, cuando repitieron el experimento utilizando cerdas que habían salido a celo de forma natural, ninguna de las 10 cerdas inseminadas con semen obtenido en los días entre 5 y 10 p.i. seroconvirtió. Sin embargo, es posible que el virus no estuviera presente en el semen utilizado en la segunda parte del estudio ya que en un bioensayo llevado a cabo utilizando semen obtenido en los días 7 y 8 p.i. no se pudo demostrar seroconversión de los lechones. Por el contrario, existen otros trabajos en los que se ha demostrado la transmisión del virus en todos los casos ya que tras inseminar a cerdas jóvenes con una mezcla de semen de dos verracos inoculados con el virus 6 días antes de la fecha prevista de salida a celo de las cerdas, éstas desarrollaron

Introducción

síntomas de la enfermedad y posteriormente seroconvirtieron (Yaeger *et al.*, 1993) y lo mismo ha sucedido con 16 cerdas inoculadas con el virus por la vía intrauterina después de haber sido cubiertas utilizando la monta natural. En este último caso sólo se pudo demostrar la seroconversión entre los días 14 y 16 p.i. sin que los animales desarrollasen ningún síntoma de la enfermedad (Lager *et al.*, 1996b). Por último, cuando se han inseminado cerdas con semen al que se le había añadido el VSRRP y con semen procedente de verracos inoculados experimentalmente se ha demostrado la transmisión en ambos casos ya que el virus se ha podido aislar en el día 5 post-inseminación del pulmón, las amígdalas, los ganglios linfáticos iliacos y los ovarios de las cerdas inseminadas (Swenson *et al.*, 1995a).

Las diferencias encontradas en la posible transmisión del virus por la vía venerea se pueden atribuir a varios factores:

1. Las cepas de virus empleadas en los distintos estudios. Se han descrito grandes diferencias en virulencia entre distintas cepas, lo cual podría conducir a una diferencia en la capacidad del virus para replicarse en el aparato reproductor de los verracos y eliminarse con el semen.
2. La dosis de virus empleada en los distintos trabajos. La dosis mínima necesaria para que se produzca la transmisión por esta vía no ha sido determinada, pero puede ser un factor importante, dado que las cantidades de virus presentes en el semen no son muy altas. En este sentido es importante el método de cubrición empleado y el tiempo que haya pasado desde que se infectó el verraco. En principio la monta natural aumentaría el riesgo de transmisión debido, al menos, a que el uso de la inseminación artificial introduce un factor de dilución, disminuyendo la cantidad de virus presente en el semen. Por otra parte, es de suponer que la cantidad de virus eliminada por los verracos sea mayor en la fase aguda de la infección y que la adición de virus obtenido en cultivos celulares en el laboratorio al semen empleado aumente la cantidad de virus presente en el mismo.
3. La posibilidad de que el virus pueda persistir en algún órgano del aparato reproductor.

Otro factor en tener en cuenta en la transmisión venérea de la enfermedad es el *status* inmunológico de la hembra en el momento de la cubrición y si la vacunación de las cerdas puede evitar este tipo de transmisión. Sin embargo, hasta la actualidad, no existen datos a este respecto.

1.5.3. Efecto del VSRRP en las cerdas

En cerdas inoculadas con el virus en distintos momentos de la gestación o bien inseminadas con semen que contenía el virus se ha observado una sintomatología parecida a la observada en los verracos, es decir, en ocasiones la infección pasa desapercibida clínicamente y los animales permanecen normales a lo largo del periodo de estudio (Swenson *et al.*, 1994b; Lager y

Introducción

Mengeling, 1995; Gradil *et al.*, 1996; Lager *et al.*, 1996b), mientras que en otras ocasiones presentan signos transitorios de depresión y anorexia (Christianson *et al.*, 1991; Plana *et al.*, 1992; Bøtner *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1996c), acompañados de temperaturas febriles entre los 2 y los 5 días p.i. (Terpstra *et al.*, 1991; Christianson *et al.*, 1991, 1992, 1993). En algunos casos se han descrito zonas cianóticas en la piel, especialmente en las orejas y signos respiratorios transitorios (Terpstra *et al.*, 1991).

En cuanto al efecto que la infección por este virus puede tener en la reproducción, en primer lugar existe controversia acerca del efecto que la presencia del virus en el semen tiene en la cerda. En algunos casos se han descrito retornos cíclicos a celo, a los 21 días de la inseminación (Yaeger *et al.*, 1993), pero en otros no ha sido así, ya que, aunque en algunos trabajos se han observado tasas de concepción más bajas en las cerdas infectadas que en las cerdas testigos, no siempre ha sido así y, en cualquier caso, nunca se ha podido demostrar que existan diferencias estadísticamente significativas entre los resultados obtenidos en ambos grupos (Swenson *et al.*, 1994b, 1995a; Lager *et al.*, 1996b). Así, en uno de los estudios realizados (Swenson *et al.*, 1994b) se observó una tasa de concepción más baja en los animales inseminados con semen que contenía el virus que en el grupo de las cerdas testigos, ya que en el primer grupo un 20% de los animales estaban gestantes en el momento del sacrificio, llevado a cabo a los 34 días de la cubrición, y en el segundo lo estaban un 66%. Resultados similares a los anteriormente mencionados han sido obtenidos por Lager *et al.* (1996b). En su estudio, un 63% de las cerdas quedaron gestantes dentro del grupo de cerdas inoculadas por la vía intrauterina en el día 1 de gestación frente al 83% en el grupo de las testigos, sin que se observaran diferencias en el mantenimiento de la gestación ni en el tamaño de la camada (9,7 lechones en el grupo de las inoculadas y 9,2 en el grupo de las testigos), lo cual indica que tampoco existían diferencias en la tasa de fertilización. Por último, Swenson *et al.* (1995a) obtuvieron un porcentaje de cerdas gestantes del 66% en el grupo de las expuestas al VSRRP frente a un 50% en el grupo de las testigos. Además, cuando se han inoculado cerdas en el día de la cubrición, no sólo no se ha producido un fallo reproductivo sino que, además, se ha conseguido una protección total frente a una nueva inoculación con una cepa homóloga en el día 90 de gestación y una protección parcial con una cepa heteróloga (Lager *et al.*, 1995).

Los resultados de estos trabajos indican que la inoculación con el VSRRP no tiene un efecto claro sobre las tasas de concepción y fertilización y, en el caso de que tenga alguno, no se conoce cuál es el mecanismo que puede causar la disminución en la tasa de concepción observada en ocasiones, ya que se ha demostrado que las cerdas pueden concebir aún en presencia del virus, indicando que éste no interferiría con la concepción ni la fertilización (Swenson *et al.*, 1995a). Sin embargo, el VSRRP se ha aislado en el día 5 post-inseminación de los ovarios de cerdas

Introducción

inseminadas con semen contaminado experimentalmente y, aunque las cerdas habían concebido y presentaban embriones que se desarrollaban normalmente, no se sabe el papel que podría tener su presencia en esta localización en el posterior mantenimiento de la gestación (Swenson *et al.*, 1995a).

Por otra parte, la mayoría de los casos de SRRP que se presentan en el campo cursan fundamentalmente con un fallo reproductivo en el último tercio de gestación. De esta forma, se pueden presentar partos prolongados y difíciles (Mengeling *et al.*, 1994) y partos prematuros (Terpstra *et al.*, 1991; Christianson *et al.*, 1992; Plana *et al.*, 1992) o tardíos (Bøtner *et al.*, 1994; Mengeling *et al.*, 1996d).

Cuando se ha estudiado en condiciones experimentales el efecto que el VSRRP tiene en las cerdas a lo largo de la gestación se ha descubierto que en los dos primeros tercios de la misma su importancia es relativamente baja cuando se compara con el efecto que tiene en el último tercio. De esta forma, cuando se inoculan cerdas al final de la gestación se pueden reproducir experimentalmente los síntomas observados en el campo. Los resultados obtenidos en los diferentes trabajos muestran unanimidad en el efecto que tiene el virus sobre los fetos en este periodo, ya que se ha demostrado en repetidas ocasiones un fallo reproductor bastante constante caracterizado por abortos tardíos o partos prematuros y el nacimiento de lechones muertos o nacidos débiles, los cuales están, en muchos casos, infectados al nacimiento. Así, en el primer trabajo realizado reproduciendo experimentalmente la enfermedad cuando todavía no se había aislado el agente causal, se observó que la mitad de las cerdas inoculadas presentaron abortos tardíos o partos prematuros, pariendo hasta 7 días antes de la fecha prevista del parto y que más del 50% de los lechones nacieron muertos, encontrándose tanto lechones nacidos muertos como fetos momificados que habían muerto al final de la gestación (Christianson *et al.*, 1991). Resultados similares han sido obtenidos en la mayoría de los trabajos realizados inoculando cerdas alrededor del día 90 de gestación (Terpstra *et al.*, 1991; Christianson *et al.*, 1992; Lager *et al.*, 1994). En el primero de ellos el tamaño medio de la camada fue de 7,7 lechones nacidos vivos (representando un porcentaje del 60%) y 4,6 lechones nacidos muertos. Además, el 40% de los primeros fueron lechones nacidos débiles que murieron en las primeras semanas de vida. El porcentaje de camadas infectadas fue del 75%, aislándose el virus del 43,8% de los lechones nacidos débiles y del 85% de los lechones nacidos muertos estudiados. Además, el 22,8% de las muestras de sangre y el 55,6% de las muestras de líquido ascítico estudiadas presentaban anticuerpos frente al VSRRP. Por su parte, Christianson *et al.* (1992) consiguieron adelantar los partos entre 2 y 7 días, obteniendo un tamaño medio de camada de 5,8 lechones nacidos vivos y 6 nacidos muertos. En este caso, el 100% de las camadas estaban infectadas con un porcentaje de lechones infectados, considerando en su conjunto tanto los lechones nacidos vivos como los nacidos muertos, del 65,8%. Por último,

Lager *et al.* (1994) reprodujeron los abortos tardíos ya que el 33% de las cerdas inoculadas en el día 90 de gestación abortaron entre los días 14 y 17 p.i., presentando el resto un alto número de fetos que había muerto recientemente. En el único trabajo realizado al final de la gestación utilizando una cepa española del virus, los resultados obtenidos estuvieron en la línea de los anteriormente mencionados. En este estudio se produjeron partos prematuros y el tamaño medio de la camada fue de 7,7 lechones nacidos vivos, de los cuales 3,3 eran lechones nacidos débiles que murieron en el primer día de vida, y 3 lechones nacidos muertos de los cuales 2,3 eran momificados. El virus se pudo aislar de 1 de los lechones nacidos muertos y de 7 de los 10 lechones nacidos débiles (Plana *et al.*, 1992). Sin embargo, también existen estudios (Bøtner *et al.*, 1994) en los que no se han podido reproducir los síntomas característicos de la enfermedad, aunque el 100% de las camadas estaban infectadas y se pudo aislar el virus del 50% de los lechones nacidos vivos y nacidos muertos, detectándose además anticuerpos en el 11,8% de los lechones nacidos vivos. Tampoco Benfield *et al.* (1997) han podido reproducir los abortos y el número elevado de lechones nacidos muertos que es característico de la enfermedad, aunque en su estudio el 50% aproximadamente de los lechones se clasificaron como lechones débiles al nacimiento y el 80% eran virémicos. Estos lechones desarrollaron una infección por *Streptococcus suis* y su mortalidad en lactación alcanzó el 45%. Además, como característica más llamativa, presentaron una disnea muy marcada la cual estos autores han postulado que se debe a la infección *in utero* de los fetos y que no es posible reproducirla cuando la infección se produce tras el nacimiento.

Por otra parte, se sabe que los lechones que nacen virémicos presentan virémias muy prolongadas, disminuyendo a partir de las 6 ó 7 semanas de vida. En estos animales, el virus se puede aislar de las amígdalas y los ganglios linfáticos cuando se sacrifican entre los 60 y los 130 días de vida, habiéndose detectado el virus incluso a los 210 días de vida. Sin embargo, la distribución del virus a esta edad es mucho más limitada que la que existe en el momento del nacimiento cuando es posible aislarlo de prácticamente todos los órganos. Estos resultados apuntan a la posibilidad de que la infección *in utero* dé lugar a la aparición de animales persistentemente infectados (Benfield *et al.*, 1997).

Las diferencias en los resultados de los trabajos llevados a cabo en el último tercio de gestación se pueden deber a diferencias de patogenicidad entre distintas cepas. Estas diferencias se han puesto de manifiesto con mayor claridad cuando se han inoculado cerdas con distintas cepas del VSRP al final de la gestación. Así, en un trabajo realizado utilizando 4 cepas, 3 de ellas de alta virulencia y 1 de baja virulencia, se observó que sólo una de ellas (un aislado de campo) producía abortos tardíos, a los 108 días de gestación. El resto de los animales parieron en las fechas previstas, aunque existieron diferencias en las camadas de las cerdas de los distintos

Introducción

grupos, siendo algunas prácticamente normales, mientras que en otras aparecieron lechones nacidos muertos y momificados. En cuanto a la presencia del virus en los mismos, hay que destacar que el VSRRP se aisló del 44% de los lechones y los fetos procedentes de todas las cerdas, en igual proporción de los lechones nacidos vivos y de los lechones nacidos muertos, habiéndose aislado incluso de 3 lechones momificados. Además 28 lechones nacidos vivos, 13 lechones nacidos muertos y 2 fetos momificados fueron seropositivos (Park *et al.*, 1996c). Resultados similares se han obtenido inoculando cerdas, aproximadamente en el día 90 de gestación, con cada una de 4 cepas diferentes, incluyendo 3 cepas americanas virulentas y la cepa de la vacuna RespPRRS® (Mengeling *et al.*, 1996d). Cuando se compararon los resultados obtenidos se observaron diferencias importantes en el número de lechones nacidos vivos, muertos y fetos momificados, obteniéndose camadas normales en las cerdas inoculadas con la cepa de la vacuna RespPRRS®. También en este caso el virus se pudo aislar de los fetos o lechones procedentes de todas las cerdas inoculadas, aunque la frecuencia de aislamiento en los fetos que habían muerto al final de la gestación fue más baja que en los lechones nacidos vivos o muertos (el 16,6% frente al 56,2%). De la misma manera quedó demostrado que, independientemente del efecto que pudieran producir en la reproducción, todas las cepas utilizadas habían producido viremias detectables y se habían distribuido por todo el organismo ya que el virus se pudo aislar de muestras obtenidas de todas las cerdas inoculadas a lo largo del periodo de estudio y de los macrófagos alveolares de al menos la mitad de ellas en el momento del sacrificio en el día 49 p.i., aun cuando en este momento ya no se detectaba en el suero. Además, fue posible determinar la presencia de anticuerpos frente al virus en el suero o los fluidos torácicos de 1 ó más lechones o fetos de 13 de las 16 cerdas utilizadas. Los resultados de estos trabajos indican que todas las cepas estudiadas, incluyendo las cepas de baja virulencia y la cepa vacunal, pueden atravesar la barrera placentaria e infectar a los fetos. Sin embargo, no todas producen los mismos efectos adversos en la reproducción.

Además de los estudios realizados en el último tercio de la gestación ya mencionados, se han llevado a cabo otros inoculando cerdas en distintos momentos de la gestación para ver si existen diferencias en el efecto que tiene la inoculación con el VSRRP a lo largo de la misma. Los resultados obtenidos cuando se han infectado cerdas en los días 30, 50, 70 y 90 de gestación indican que el VSRRP se aísla en un porcentaje más alto, con diferencias estadísticamente significativas, en los fetos, en los lechones nacidos muertos y en los lechones nacidos vivos procedentes de cerdas inoculadas en el día 90 de gestación que en los procedentes de cerdas inoculadas en el día 70 de gestación o antes de este momento. Así, ninguna de las camadas procedentes de las cerdas inoculadas en el día 30 de gestación estaba infectada, mientras que en los días 50 y 70 de gestación el 33,3% de las camadas estaban infectadas con un porcentaje de fetos positivos del 3,2% y el 10,5% respectivamente. En el día 90 de gestación, por el contrario, el

Introducción

100% de las camadas estaban infectadas y el 75% de los lechones nacidos vivos o nacidos muertos eran positivos. Además, tal como se ha demostrado en los trabajos llevados a cabo en el último tercio de la gestación, algunos de los lechones procedentes de cerdas inoculadas en el día 90 de gestación presentaban anticuerpos frente al virus antes de mamar el calostro. Sin embargo, ninguno de los lechones procedentes de cerdas inoculadas en los días 50 ó 70 de gestación fueron virémicos ni presentaban anticuerpos en el momento del nacimiento, aislándose el virus únicamente en un feto procedente de una cerda sacrificada a los 41 días p.i. e inoculada en el día 50 de gestación y de 2 fetos de una cerda inoculada el día 70 de gestación y sacrificada también 41 días después (Mengeling *et al.*, 1994). Por otra parte, hay que destacar que sólo una de las cerdas que terminaron la gestación presentó un parto prematuro (en el día 111 de gestación). La mayoría de los lechones nacidos vivos de las cerdas que se dejaron parir estaban débiles y presentaban signos respiratorios aunque no tan graves como para haber producido la muerte de los lechones que murieron en las semanas siguientes al parto.

Resultados similares a los anteriores han sido obtenidos en otros trabajos como el realizado por Lager *et al.* (1996a) en el cual sólo un 25% de las camadas procedentes de cerdas inoculadas en el día 30 de gestación se infectaron, frente al 100% de las camadas procedentes de cerdas inoculadas en el día 90 de gestación, o el realizado por Christianson *et al.* (1993) en el cual no se pudo aislar el VSRRP de ninguno de los fetos procedentes de cerdas inoculadas intranasalmente entre los días 45 y 50 de gestación cuando se sacrificaron en los días 7, 14 ó 21 p.i., mientras que de las cerdas que se dejaron terminar la gestación se obtuvieron 2 lechones nacidos vivos virémicos en 1 camada y fue posible detectar la presencia de anticuerpos en 2 nacidos muertos de la otra. Además, los fetos de las cerdas sacrificadas tras la inoculación se estaban desarrollando normalmente y el número de lechones nacidos vivos y muertos fue normal en las que se dejaron terminar la gestación.

Por el contrario, también existen evidencias de que es posible que se produzcan alteraciones al comienzo de la gestación como lo demuestra el trabajo llevado a cabo por Lager *et al.* (1994) en el cual, aunque todas las camadas procedentes de cerdas expuestas el día 1 de gestación aparecían normales alrededor del día 111, el 83% de las procedentes de cerdas expuestas en el día 30 de gestación presentaban signos de que se hubiera producido un fallo reproductor, con un 30% de abortos entre los 6 y los 10 días p.i. y un 10% más de cerdas que habían perdido la gestación antes del día 50 (Lager *et al.*, 1994). Este trabajo, por tanto, pone de manifiesto la posibilidad de que se produzcan abortos tempranos como consecuencia de la infección por el VSRRP.

Los resultados obtenidos cuando se han inoculado cerdas en los distintos momentos de la gestación han llevado a plantear la cuestión de si la falta de efecto del virus observada en la primera

Introducción

mitad de la misma se debe a una incapacidad de los fetos para permitir la replicación del virus o a una falta de habilidad de este último para atravesar la barrera placentaria. Para resolver esta cuestión se han realizado inoculaciones directas a los embriones o fetos aproximadamente en el segundo tercio de gestación. De esta forma, inoculando los embriones o fetos de uno de los cuernos uterinos de cerdas gestantes desde el día 34 hasta el día 85 de gestación se ha comprobado que tanto unos como otros son susceptibles a la infección por el virus y que las cerdas pueden seroconvertir tras la inoculación de los mismos, indicando que el virus tiene capacidad para cruzar la placenta, al menos en dirección materna, e infectar a la cerda. En el momento de la necropsia, entre 17 y 31 días p.i. el virus se pudo detectar en los fetos inoculados y, en algunos casos, también en algunos de los fetos del cuerno uterino que actuaba como testigo, deduciéndose por la posición de los mismos que su infección no había sido por diseminación intrauterina del virus sino por infección transplacentaria. Por otra parte hay que destacar que los fetos expuestos al virus entre los días 45 y 85 de gestación presentaban con frecuencia alteraciones causadas por el virus desde la presencia de edemas y hemorragias a la muerte y momificación de los mismos. Sin embargo, los embriones o fetos inoculados antes de este momento no presentaban de forma constante lesiones, aunque sí fueron positivos cuando se estudió la presencia del virus en ellos. Resultados parecidos se obtuvieron inoculando con el VSRRP por la vía intramuscular o intraamniótica fetos de entre 45 y 50 días *in utero*, solo o con anticuerpos específicos, ya que fue posible aislar el virus en los días 4 y 11 p.i., demostrándose además que la presencia de anticuerpos específicos potencia la multiplicación del virus (Christianson *et al.*, 1993). Los resultados de estos estudios llevaron a plantear la posibilidad de que, aunque el virus se puede replicar en fetos de cualquier edad, la capacidad de producir lesiones y muerte fetal sólo se adquiere en la segunda mitad de la gestación (Lager y Mengeling, 1995).

Hay que tener en cuenta a la hora de valorar el efecto de la infección por el virus durante la gestación que en la mayoría de las ocasiones no se ha podido aislar de tejidos procedentes de fetos que hubieran muerto en el utero, estuvieran momificados o no. Sin embargo, con frecuencia se ha encontrado un número muy alto de fetos muertos cuya muerte había sido posterior a la exposición de su madre al virus, en función del tamaño que tenían, y en los cuales no ha sido posible determinar otra causa de muerte, de forma que ésta se ha atribuido al efecto del VSRRP (Christianson *et al.*, 1993; Mengeling *et al.*, 1994, 1996d).

Otra cuestión a tener en cuenta es cómo llega el virus a los fetos. Aunque no se sabe cuál es el mecanismo exacto que produce su infección en el caso del VSRRP, en general los virus patógenos pueden atravesar la unión materno-fetal en forma de virus libre en la circulación y/o como virus asociados a ciertas células maternas que migran a través de la barrera. Una vez en la zona fetal, los virus pueden infectar los tejidos placentarios o entrar a la circulación y/o al amnios y

así al feto. En este caso, aunque la ruta amniótica parece ser improbable, es posible.

De todo lo anteriormente expuesto se deduce que los embriones y fetos al principio y hacia la mitad de la gestación también son susceptibles a la infección por el VSRRP. Sin embargo, el porcentaje de infección es muy bajo o nulo cuando se infecta a la madre por la vía oronasal, demostrándose esta infección sólo cuando se inoculan directamente los fetos (Christianson *et al.*, 1993; Lager y Mengeling, 1995). De hecho, no se conoce en qué momento de la gestación se han infectado los lechones que han nacido virémicos, aún cuando la infección de la madre haya sido hacia la mitad de la gestación, pudiendo ocurrir, al menos en algunas ocasiones, que los fetos se infecten pocas semanas antes del nacimiento, ya en el último tercio de gestación. Esta teoría es posible ya que algunas cerdas pueden permanecer infectadas durante al menos 99 días (Zimmerman *et al.*, 1992). Teniendo en cuenta los factores mencionados, es posible que la probabilidad de que se produzca un fallo en la reproducción dependa fundamentalmente de la incidencia de la infección transplacentaria que podría reflejar diferencias en las características histológicas de la barrera placentaria ya que al principio de la gestación existen 6 capas histológicas que separan la circulación materna y fetal, mientras que al avanzar la gestación, la vascularización se hace más íntima, tomando una posición subepitelial y produciéndose una invasión de los trofoblastos por los capilares fetales. Como consecuencia los capilares materno-fetales de la placenta se convierten en un órgano de intercambio más eficaz al avanzar la gestación (Christianson *et al.*, 1993). Sin embargo, la mayor incidencia de infección transplacentaria al final de la gestación se puede deber simplemente a una mayor oportunidad debido al mayor aporte sanguíneo y al mayor intercambio materno-fetal en este momento.

La infección de los fetos en el útero se puede producir por dos mecanismos distintos: 1° por difusión intrauterina y 2° por infección transplacentaria. En el caso del VSRRP todavía no se ha establecido con certeza cuál de los 2 mecanismos es el implicado. En algunos trabajos se afirma que es posible que el primer tipo de infección haya ocurrido ya que se encuentran fetos en distinto estado de autólisis y también fetos vivos (Christianson *et al.*, 1992). Sin embargo, en otros se sospecha del segundo tipo de infección debido a la distribución de los fetos infectados (Lager y Mengeling, 1995).

Además de encontrarse en los fetos, el VSRRP ha sido aislado de los ovarios de cerdas inoculadas en el momento de la cubrición (Swenson *et al.*, 1995a) y de la placenta de cerdas inoculadas experimentalmente (Christianson *et al.*, 1993; Mengeling *et al.*, 1994). Estudios de microscopía electrónica han revelado la presencia del virus en la superficie de las células endoteliales de los vasos sanguíneos de la placenta materna y, en ocasiones, en el sistema de canales intercelulares entre las células epiteliales uterinas y en las células endoteliales de los

Introducción

capilares de la placenta fetal (Stockhofe-Zurwieden *et al.*, 1993). No sólo es posible encontrar el VSRRP en esta localización sino que con frecuencia se producen lesiones tales como miometritis, endometritis y placentitis multifocal caracterizada por una vasculitis multifocal linfohistiocítica con una infiltración celular perivascular en el endometrio y la parte materna de la placenta, siendo la lámina propia del endometrio la más afectada, pero sin que se afecte el lado fetal de la placenta (Christianson *et al.*, 1992; Stockhofe-Zurwieden *et al.*, 1993; Lager y Halbur, 1996). Además se han observado cambios degenerativos con la presencia de microseparaciones multifocales de las capas epiteliales de la unión materno-fetal que dan lugar a la separación prematura de la unión materno-fetal (Stockhofe-Zurwieden *et al.*, 1993). Por otra parte, también se ha descrito la presencia de áreas hemorrágicas en el cordón umbilical que histológicamente corresponden a una arteritis necrotizante con zonas de hemorragia periarteriales que se encuentran con mayor frecuencia en los lechones que son virémicos. Las alteraciones del sistema vascular del endometrio, la placenta materna y de la zona de contacto materno-fetal juegan un papel importante en la producción de una insuficiencia placentaria y pueden conducir a una hipoxia fetal, dando lugar a la aparición de abortos a término, lechones nacidos muertos y lechones nacidos débiles, pudiendo ser éste el mecanismo que da lugar al fallo reproductivo característico de la enfermedad, aunque también podrían ser consecuencia de las lesiones en el cordón umbilical que dan lugar a fenómenos de hipoxia por la interrupción del flujo normal de sangre a través del mismo debido a la necrosis de las paredes arteriales y la hemorragia que se produce en el tejido perivascular, seguido de la distensión del cordón y la oclusión de los vasos umbilicales (Lager y Halbur, 1996).

Este mecanismo de producción de la muerte fetal, como consecuencia de las alteraciones de la vascularización del endometrio y/o a la presencia de una arteritis necrotizante del cordón umbilical, explicaría porqué no se suelen detectar lesiones ni en los lechones nacidos vivos ni en los nacidos muertos procedentes de cerdas inoculadas al final de la gestación (Christianson *et al.*, 1992; Plana *et al.*, 1992; Bøtner *et al.*, 1994), ya que la muerte se produciría por hipoxia. Sin embargo, sí se han descrito lesiones pulmonares en fetos expuesto *in utero* al VSRRP, siendo de mayor gravedad y frecuencia en los fetos expuestos al virus entre los días 45 y 49 de gestación. Las lesiones encontradas son hemorragias focales en el intersticio del mesenquima que rodea a los bronquios y los vasos sanguíneos, con necrosis de la musculatura lisa que rodea a los bronquios y las células mesenquimatosas subyacentes a las células del epitelio bronquial, que, en ocasiones, presenta focos de necrosis. Además, con frecuencia se encuentran células mononucleares en el intersticio peribronquial. El virus se puede observar mediante técnicas de inmunofluorescencia en secciones de los pulmones (Lager y Ackerman, 1994) y, en el caso de los lechones nacidos vivos pueden desarrollar lesiones de neumonía intersticial multifocal (Plana *et al.*, 1992; Bøtner *et al.*, 1994). Además de estas lesiones características, se han descrito otras incluyendo edemas que pueden aparecer en el cordón umbilical y también alrededor del hígado y el bazo y en el mesenterio

que rodea al colon espiral. También es posible que aparezcan fetos cubiertos de meconio o una mezcla pegajosa de meconio y líquido amniótico (Lager y Halbur, 1996).

1.6. SINTOMATOLOGÍA

Una de las principales características de los brotes de SRRP es la variabilidad en la sintomatología observada (Fiedler, 1991; White, 1992; Done y Paton, 1995), con la descripción cada vez más frecuente de infecciones subclínicas (Robertson, 1992a; Morrison *et al.*, 1992b). Además, es prácticamente imposible medir los efectos causados por la infección por el VSRRP por sí solo ya que, normalmente, se complica con infecciones secundarias (Loula, 1991; de Jong *et al.*, 1991a; Blackburn, 1991; Blaha, 1992), siendo estas últimas las que determinan frecuentemente la presentación de la enfermedad (Done y Paton, 1995). De esta forma, se ha comprobado que en granjas con un alto nivel sanitario la enfermedad, por sí misma, no es muy grave (Blaha, 1992; Mortensen y Madsen, 1992). Debido a las características anteriormente mencionadas, se han atribuido las diferencias clínicas de la enfermedad en las distintas granjas a tres factores:

1. Diferencias en la virulencia de los distintos aislados.
2. Infecciones conjuntas con otros virus o bacterias.
3. Diferencias en el manejo, el flujo de animales y las instalaciones en las distintas granjas (Polson, 1996).

La sintomatología sistémica, que es la primera en aparecer, puede incluir la muerte de los animales afectados, especialmente en la fase aguda de la infección (Hopper *et al.*, 1992), pero suelen predominar la anorexia, la pirexia, la agalaxia, la letargia y, en ocasiones, la cianosis en la piel (Meldrum, 1991). La anorexia se suele presentar en realidad más bien como una inapetencia transitoria que aparece a lo largo de varios días en distintos animales de forma que no suelen estar afectados más del 20 ó el 30% al mismo tiempo (Blackburn, 1991; Loula, 1991; Gordon, 1992). La pirexia tampoco afecta a todos los animales de forma que sólo un 30%, como máximo, presentan temperaturas elevadas que rara vez superan los 40°C, aunque pueden alcanzar los 41°C. En cuanto a la cianosis, aparece sólo en algunos casos y ha sido descrita con mayor frecuencia en Europa que en EE.UU., superando rara vez el 5% de los animales afectados (de Jong *et al.*, 1991a). La coloración cianótica se presenta sobre todo en las orejas, la vulva, las extremidades y ciertas zonas de la piel que presentan placas eritematosas. La duración de la misma suele ser muy corta, de horas habitualmente, aunque puede durar desde minutos a algunos días. Normalmente aparece entre 5 y 7 días después de la aparición de los signos clínicos de la enfermedad. Estos síntomas iniciales pueden empezar en cualquier grupo de edad y, en la mayoría de los casos, se extienden rápidamente a otras zonas de producción. En granjas de ciclo cerrado esta fase aguda

Introducción

puede afectar a entre el 5% y el 50% de los animales (de Jong *et al.*, 1991a; White, 1992).

Los signos respiratorios, que incluyen la presencia de disnea y polipnea, pueden ser observados o no en la fase aguda en los animales adultos, pero son los síntomas que predominan normalmente en los animales más jóvenes, apareciendo frecuentemente una respiración abdominal en los lechones que están en lactación y en los recién destetados.

A las 2 ó 3 semanas de los primeros síntomas empiezan a aparecer los problemas asociados a la reproducción, que pueden durar de 4 a 5 meses, afectando a un ciclo reproductivo completo dentro de una granja, aunque con frecuencia se presentan durante 8 a 12 semanas. Los abortos, característica importante de la enfermedad, se pueden presentar en cualquier momento desde los 22 días de gestación hasta los 109 días, aunque son mucho más frecuentes los tardíos y también los partos prematuros y tardíos. Así, los partos prematuros afectan a entre un 5% y un 30% de las cerdas durante un brote (de Jong *et al.*, 1991a; Loula, 1991; Raymarkers, 1991; Vogel *et al.*, 1991; Hopper *et al.*, 1992). Las camadas afectadas contienen una mezcla de lechones nacidos muertos, fetos momificados y fetos macerados además de lechones nacidos débiles y lechones aparentemente normales. El porcentaje de lechones nacidos muertos, que puede alcanzar el 35% (de Jong *et al.*, 1991a; Loula, 1991; Hopper *et al.*, 1992), alcanza su máximo al principio de la aparición de los síntomas reproductivos y posteriormente disminuye para dar lugar a un aumento en el número de fetos momificados que puede llegar al 25% (de Jong *et al.*, 1991a; Loula, 1991; Hopper *et al.*, 1992) al cabo de algunas semanas. Aunque el tamaño de los fetos momificados va disminuyendo conforme avanza en duración el brote, es muy raro que aparezcan fetos de menos de 17 cm. El efecto neto del aumento en el número de lechones nacidos muertos y de fetos momificados es una reducción media de 4 lechones en el número de lechones nacidos vivos durante un brote de la enfermedad (Polson *et al.*, 1990).

Otra característica que se ha asociado con el SRRP es la infertilidad, que incluye repeticiones acíclicas y anoestros (Keffaber, 1989; Hoefling, 1990; Gordon, 1992; Hopper *et al.*, 1992), aunque existe una cierta controversia en este tema, ya que, en ocasiones, no se observan cambios en el porcentaje de repeticiones ni se altera el intervalo entre partos (Grosse Beilage y Grosse Beilage, 1993).

En los verracos, además de la sintomatología sistémica descrita al principio de este apartado, se ha observado una pérdida de la libido (Feitsma *et al.*, 1992; Hopper *et al.*, 1992) y una reducción temporal en la calidad espermática, incluyendo una reducción en la motilidad de los espermatozoides y un aumento en el porcentaje de morfoanomalías (de Jong *et al.*, 1991a; Feitsma *et al.*, 1992; Teuffert *et al.*, 1995), que ha conducido a una disminución de entre el 2% y el 10% en

Introducción

el número de eyaculados utilizables en los centros de inseminación artificial durante al menos 3 semanas, empezando 4 semanas después de la aparición de los síntomas clínicos (Feitsma *et al.*, 1992).

La mortalidad y la morbilidad de los lechones en lactación es una de las principales características de la enfermedad ya que, entre los lechones que nacen vivos, el porcentaje de lechones débiles es muy alto, especialmente si el parto ha sido prematuro, pudiendo afectar, en algunas camadas, al 100% de los animales (Blackburn, 1991; Raymarkers, 1991; Ahl *et al.*, 1992). Estos lechones suelen ser demasiado débiles para mamar, dando lugar a la aparición de mastitis en las cerdas y provocando un aumento en la mortalidad en lactación al aumentar el número de lechones que mueren por inanición y por aplastamiento durante la primera semana de vida (Dial *et al.*, 1990; Blackburn, 1991; Dee, 1992; Hopper *et al.*, 1992). Otra complicación que se presenta en los lechones es la aparición de los síntomas respiratorios del SRRP que dan lugar a una respiración abdominal, acompañada de estornudos, conjuntivitis y edema parpebral (Keffaber, 1989; de Jong *et al.*, 1991a; Ahl *et al.*, 1992; Hopper *et al.*, 1992), limitándose este último normalmente a la primera semana de vida (Rossow *et al.*, 1994a). También se han observado diarreas que no responden al tratamiento, aunque no son una característica constante (Keffaber, 1989; Blackburn, 1991; Ahl *et al.*, 1992). Por otra parte, se han descrito alteraciones circulatorias en los lechones recién nacidos, apareciendo hemorragias importantes en el cordón umbilical, al cortarles la cola o al castrarlos y hematomas de gran extensión en los puntos de inyección del hierro (Hopper *et al.*, 1992). Además, suele aparecer una linfopenia y una leucopenia en los animales afectados (Rossow *et al.*, 1994a). En EE.UU. se ha descrito, como consecuencia de lo anteriormente expuesto, un aumento en la mortalidad en lactación desde el 3,1% antes de un brote de la enfermedad hasta el 7,4% de media después del mismo (Stevenson *et al.*, 1993), aunque puede alcanzar un 80% si se consideran los datos de producción de determinadas semanas de forma aislada (Loula, 1991). En Europa, durante los primeros brotes, se manejaban cifras del 40% de mortalidad durante la lactación a causa, fundamentalmente, de las infecciones secundarias asociadas (Meldrum, 1991).

La fase aguda puede durar varios meses y normalmente va seguida de una forma crónica en la que se presentan problemas respiratorios, fundamentalmente después del destete, por lo que ha recibido la denominación de "síndrome respiratorio del post-destete" que, en EE.UU., se ha descrito que puede durar hasta 2 años (Loula, 1991) y es la forma más frecuente de presentación de la enfermedad en este país en la actualidad, dando lugar a unas pérdidas económicas muy importantes (Dee, 1996). La principal característica de este síndrome, tanto cuando se presenta antes como cuando se presenta después del destete, es el desarrollo de enfermedades secundarias (Blaha, 1992; White, 1992; Pijoan *et al.*, 1994). Así, se han encontrado con frecuencia otros virus

Introducción

asociados con el VSRRP tales como el virus de la influenza porcina y el coronavirus respiratorio en El Reino Unido, el virus de la encefalomiocarditis en EE.UU. (Carlson, 1992) y paramixovirus tanto en EE.UU. (Halbur *et al.*, 1993) como en Francia (Brun *et al.*, 1992); en Canadá se le ha atribuido un papel importante al VSRRP en la presentación de la enfermedad denominada neumonía proliferativa y necrotizante (Magar *et al.*, 1994). Además, la prevalencia de determinadas enfermedades bacterianas aumenta tras un brote de SRRP (Collins y Rossow, 1993; Zeman *et al.*, 1993). Entre ellas destaca la presencia de *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Salmonella choleraesuis*, *Actinobacillus pleuropneumoniae*, *Mycoplasma hyopneumoniae* y *Pasteurella multocida* en EE.UU. y de *Mycoplasma hyorhinis* en Japón (Shimizu *et al.*, 1994), el cual, aunque en condiciones normales presenta una patogenicidad dudosa, produce graves lesiones pulmonares cuando se encuentra en animales que padecen SRRP (Kawashima *et al.*, 1996).

Los cerdos afectados durante el cebo pueden presentar los signos típicos de SRRP, mostrando disnea, polipnea, conjuntivitis y rinitis y además los de las enfermedades secundarias que lo acompañan. Normalmente presentan una mala respuesta a los tratamientos con antibióticos y a las vacunaciones, produciéndose esporádicamente muertes, que hacen que se duplique la mortalidad en el cebo durante un brote de la enfermedad. También se ha observado que la frecuencia de lesiones pulmonares puede aumentar desde un 30% a un 70% en los cerdos nacidos durante un brote de SRRP y que la producción anual de lechones puede disminuir entre un 5% y un 20% (Done *et al.*, 1996). Aún así, es muy difícil determinar la importancia del SRRP *per se* durante la fase de cebo ya que es probable que la mayoría de los cebaderos estén infectados sin que se presenten síntomas de la enfermedad. Así, en inoculaciones experimentales se ha demostrado que la infección por el VSRRP pasa clínicamente inadvertida, detectándose sintomatología caracterizada por la presencia de fiebre, alteraciones respiratorias y pérdidas en la producción únicamente cuando se inocula junto con otros virus como el virus de la influenza porcina o el coronavirus respiratorio porcino (van Reeth *et al.*, 1996a,b).

Normalmente los síntomas de SRRP aparecen primero en los reproductores, luego en los lechones y por último en el cebadero, aunque se ha descrito que un síndrome similar a la influenza porcina en el cebadero puede preceder a la aparición de la sintomatología en las salas de partos (Albina *et al.*, 1994).

En muy raras ocasiones se vuelve a presentar en una granja un brote de la enfermedad en su forma aguda (de Jong *et al.*, 1991b), aunque se sabe que el virus puede continuar recirculando durante largos periodos de tiempo tanto en la zona de los reproductores como en el cebadero (Harris *et al.*, 1992; Keffaber *et al.*, 1992; Terpstra *et al.*, 1992; Thacker, 1992; Stevenson *et al.*, 1993), dando lugar a la aparición de una forma crónica de la enfermedad caracterizada por la

aparición de problemas en las cerdas de renuevo y problemas respiratorios en las lechonerías. Sin embargo, hay que destacar que la mayoría de las granjas vuelven a sus parámetros reproductivos normales dentro de los 6 meses siguientes a un brote y que los efectos crónicos del SRRP son más marcados tanto en las lechonerías como en el cebadero (Stevenson *et al.*, 1994). Así, el VSRRP se ha podido aislar en lechonerías hasta 2 años y medio después del primer brote (Keffaber *et al.*, 1992; Stevenson *et al.*, 1994) y en cerdos de cebadero se han detectado anticuerpos frente al virus de 1 a 2,5 años después de un brote agudo, indicando una recirculación del virus durante la fase de crecimiento (Loula, 1992; Stevenson *et al.*, 1992, 1994).

Además de las formas de presentación de la enfermedad hasta aquí expuestas, se ha puesto de manifiesto, con el desarrollo de técnicas serológicas para la detección de anticuerpos frente al VSRRP, que existen muchas granjas seropositivas en las que nunca se ha presentado la enfermedad en su forma clínica (Edwards *et al.*, 1992; Morrison *et al.*, 1992; Cho *et al.*, 1993). Este fenómeno se ha intentado explicar por las diferencias en patogenicidad de las distintas cepas del virus tal como ha sido demostrado inoculando cerdos gnotobióticos (Paul *et al.*, 1992) y por las diferencias en el *status* sanitario de las distintas granjas (Blackburn, 1991; Blaha, 1992; Mortensen y Madsen, 1992; Paul *et al.*, 1992).

1.7. LESIONES

En los casos de SRRP en los que el proceso no está complicado por la aparición de infecciones secundarias es muy frecuente que no se aprecien lesiones macroscópicas (Done *et al.*, 1992). Lo mismo sucede con los cambios histológicos observados, que suelen ser mínimos y limitados al aparato respiratorio, salvo que existan complicaciones. Como consecuencia, se puede decir que no se producen lesiones patognomónicas y que los efectos clínicos y patológicos de la enfermedad dependen, en gran medida, de los patógenos, sobre todo respiratorios, enzoóticos en la granja.

1.7.1. Lesiones macroscópicas

En lechones de 6 ó 7 kg infectados experimentalmente se ha podido observar, de forma constante a partir del día 9 p.i. y de forma esporádica antes de este momento, la aparición de áreas de consolidación pulmonar, especialmente marcadas en la zona ventral de los lóbulos medios y el lóbulo accesorio, aunque pueden aparecer también en la zona cranial de los lóbulos caudal y apical (Ramos *et al.*, 1992). Es una consolidación multifocal moderada que se caracteriza por la presentación de una coloración oscura (Halbur *et al.*, 1995a). En ocasiones se ha descrito la presentación de un edema interlobular y de zonas grisáceas de atelectasia que afectan al 30-40% del

pulmón en el día 28 p.i.. Además, en otros órganos, se ha descrito la aparición de edemas y de hiperplasia en los ganglios linfáticos (Pol *et al.*, 1991; Halbur *et al.*, 1995a; Vézina *et al.*, 1996) y de edemas en la grasa perirrenal, peritoneal y subcutánea y en los músculos (Pol *et al.*, 1991).

En cerdos en crecimiento se producen lesiones similares, observándose focos de consolidación pulmonar, congestión de los ganglios linfáticos submandibulares y zonas hemorrágicas en la serosa del intestino grueso (Plana *et al.*, 1992b).

Cuando se han infectado experimentalmente cerdas gestantes se ha observado que tanto los lechones nacidos muertos como los nacidos débiles presentaban gran cantidad de un líquido transparente en la cavidad torácica (Plana *et al.*, 1992b), mientras que los lechones con un aspecto normal al nacimiento tenían pequeños focos de consolidación pulmonar de aspecto grisáceo al sacrificio, a la edad de 8 a 12 días.

1.7.2. Lesiones microscópicas

Las lesiones microscópicas observadas en el pulmón, cuando no existen infecciones secundarias, se limitan a la aparición de una neumonía intersticial de gravedad variable, con el hallazgo de una neumonía catarral en algunos casos (Pol *et al.*, 1991; Paton y Done, 1992). Es una neumonía intersticial proliferativa multifocal caracterizada por una hipertrofia y una hiperplasia de los neumocitos de tipo 2, una infiltración moderada en los septos alveolares de células mononucleares y un acúmulo de macrófagos, detritus celulares y células inflamatorias en los espacios alveolares y en las vías aéreas bajas (Halbur *et al.*, 1994a, 1995a; Rossow *et al.*, 1994a, 1995). Ultraestructuralmente se ha observado una degeneración de los macrófagos alveolares y de las células epiteliales tanto del pulmón como de la mucosa nasal caracterizada por la presencia de una excesiva vacuolización del retículo endoplasmático. Además de por MAP y células epiteliales, los detritus celulares están constituidos por restos necróticos de neutrófilos, células plasmáticas y neumocitos tipo 2 (Ramos *et al.*, 1992). En otros estudios se han descrito lesiones más extensas del aparato respiratorio, incluyendo la presencia de una rinitis que ha aparecido en algunos países como Holanda (Pol *et al.*, 1992) y EE.UU. (Collins *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1992) caracterizada por la pérdida de los cilios en las células epiteliales, vacuolización de las mismas y descamación de la superficie del epitelio.

También se ha descrito una linfadenopatía caracterizada por la hipertrofia y la hiperplasia de los centros germinales de los ganglios linfáticos, el bazo y las amígdalas, acompañado de una necrosis folicular, un aumento en el número de macrófagos en los sinusoides, la aparición de sincitios y, en algunas ocasiones, de estructuras similares a quistes rodeadas de células gigantes

Introducción

multinucleadas (Rossow *et al.*, 1994a,b; Halbur *et al.*, 1995a). Además se han detectado hemorragias subcapsulares en los ganglios linfáticos (Rossow *et al.*, 1995).

Otras lesiones descritas, aunque no de forma tan constante, son cambios en los vasos sanguíneos (Goovaerts y Visser, 1992), perivascularitis (Hoefling, 1990; Collins *et al.*, 1992), miocarditis multifocal con acúmulo perivascular de células mononucleares (Hoefling, 1990; Collins *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1994a; Halbur *et al.*, 1995a), esplenitis, con una deplección de linfocitos y una vacuolización de los macrófagos de la pulpa roja del bazo (Pol *et al.*, 1991; Paton y Done, 1992), deplección de los ganglios linfáticos, las criptas amigdalares y el timo (Ohlinger *et al.*, 1991a; Pol *et al.*, 1991) y encefalitis difusa no supurativa caracterizada por el acúmulo perivascular de células mononucleares (Collins *et al.*, 1992).

En los lechones nacidos muertos y nacidos débiles la lesión microscópica predominante es una neumonía intersticial multifocal con un engrosamiento de los septos alveolares y una infiltración de células mononucleares (Ramos *et al.*, 1992). Las únicas lesiones fetales descritas son una hemorragia extensa del pulmón con degeneración y necrosis bronquial (Lager y Ackerman, 1994) y la presencia de arteritis, miocarditis y encefalitis (Rossow *et al.*, 1996b). La miocarditis se caracteriza por la pérdida de fibras musculares y la sustitución de las mismas por tejido conectivo con pequeños focos intersticiales de linfocitos y células plasmáticas. La arteritis se caracteriza por la aparición de linfocitos y macrófagos rodeando a las arterias, en la túnica media y, en ocasiones, en la capa subendotelial, existiendo además focos de necrosis endotelial. En el cerebro la lesión observada es una inflamación mononuclear multifocal. Sin embargo, estas lesiones son muy esporádicas y los fetos procedentes de abortos normalmente no presentan ninguna lesión.

En la placenta se ha observado una lesión inflamatoria y degenerativa junto con partículas semejantes al virus en las células endoteliales de los capilares tanto de la placenta fetal como de la materna y, en algunas ocasiones, en las células epiteliales (Stockhofe-Zurwieden *et al.*, 1993). En el cordón umbilical se ha descrito la presencia de áreas hemorrágicas que histológicamente se corresponden con una arteritis necrotizante en la que aparecen áreas de hemorragia periarteriolar (Lager y Halbur, 1996).

Las infecciones por el SRRP producen una reducción muy marcada en el número de macrófagos alveolares que se pueden recoger en un lavado bronco-alveolar (Molitor *et al.*, 1992). En los cerdos normales los macrófagos alveolares constituyen el 90% ó más de las células recuperadas, mientras que en las infecciones agudas por el VSRRP esta proporción disminuye al 50%, produciéndose un aumento en el número de neutrófilos y linfocitos. Además, se produce la

destrucción del sistema mucociliar que constituye un mecanismo de defensa muy importante del aparato respiratorio (Done y Paton, 1995). También se ha observado una reducción en el número de linfocitos y monocitos circulantes, sobre todo de linfocitos T, tanto CD4+ como CD8+, dentro de los 3 días siguientes a la inoculación, volviendo a los niveles basales a partir del día 14 p.i. (Christianson *et al.*, 1992; Zhou *et al.*, 1992; Done y Paton, 1995). También se han observado niveles muy altos de la glicoproteína ácida alfa-I, que es una proteína indicadora del grado de daño tisular, en el suero de lechones procedentes de granjas infectadas (Bane *et al.*, 1992).

1.8. RESPUESTA INMUNOLÓGICA

Existen evidencias de que tanto los cerdos de cebadero como las cerdas que padecen el SRRP desarrollan una respuesta inmune que los protege de reinfecciones por el VSRRP (Loula, 1991; Beilage y Beilage, 1992; Benfield *et al.*, 1992b; Gorcyca *et al.*, 1993). Así, se ha demostrado que cerdas infectadas previamente no transmiten el virus a los fetos ni sufren un fallo reproductivo cuando se reinfectan en el último tercio de la gestación (Gorcyca *et al.*, 1993; Lager *et al.*, 1994). Sin embargo, existen datos que parecen indicar que cuando los animales se reinfectan más de 5 meses después de la primera infección sí pueden desarrollar de nuevo la enfermedad (Plana Durán *et al.*, 1992a).

La primera evidencia de la existencia de una respuesta inmune es la producción de anticuerpos específicos frente al VSRRP que se pueden detectar a partir del día 6 ó 7 p.i., lo cual no impide que los cerdos puedan permanecer virémicos durante largos periodos de tiempo (Paton *et al.*, 1991; Edwards *et al.*, 1992; Yoon *et al.*, 1993; Halbur *et al.*, 1996), detectándose el virus en el suero incluso en el día 63 p.i. (Vézina *et al.*, 1996). La coexistencia de virus y anticuerpos durante este periodo de tiempo llevó a pensar que los anticuerpos tempranos no son capaces de neutralizar el virus y que, posiblemente, hasta que no aparecen los anticuerpos neutralizantes, que son de aparición más tardía, no se consigue eliminar el virus de la circulación. Esta hipótesis está apoyada por el hecho de que las cerdas, que desarrollan los anticuerpos neutralizantes más rápidamente que los animales de cebadero, presentan viremias más cortas que éstos (Collins *et al.*, 1991). Sin embargo, no se ha podido demostrar la capacidad de neutralización del virus por los anticuerpos en cultivos de MAP, perfilando la posibilidad de que los anticuerpos, posiblemente, en lugar de eliminar el virus, faciliten la infección de los macrófagos mediante la formación de inmunocomplejos que se unirían a estos últimos mediante la fracción Fc de los anticuerpos. Esta posibilidad está apoyada por estudios *in vivo* en los que se ha demostrado que el virus es capaz de multiplicarse en los macrófagos alveolares y de eliminarse en animales con anticuerpos neutralizantes, pudiendo infectar a otros cerdos (Ohlinger, 1995). Es más, se ha demostrado que la presencia de anticuerpos hace que se alcancen títulos víricos de 10 a 100 veces superiores cuando

Introducción

se infectan con el VSRRP cultivos de macrófagos (Choi *et al.*, 1992), aunque esta estimulación de la replicación vírica depende de la cepa que se estudie (Yoon *et al.*, 1995b). Además, existen evidencias de que este fenómeno se produce también *in vivo*, ya que se ha demostrado que, cuando se infectan fetos porcinos con una mezcla de virus y anticuerpos, se estimula la replicación del virus (Christianson *et al.*, 1993).

En cuanto a la cinética de aparición de los anticuerpos, los primeros en aparecer, que son las IgMs, por la técnica de la inmunofluorescencia indirecta (IFI), se pueden detectar al final de la primera semana p.i., alcanzando un pico entre los 14 y los 21 días p.i. y disminuyendo a partir de ese momento hasta niveles no detectables entre los días 35 y 63 p.i. (Loemba *et al.*, 1996; Vézina *et al.*, 1996). Las IgGs aparecen a continuación, alcanzando su pico máximo entre las 3 y las 4 semanas p.i. y permaneciendo sin cambios apreciables durante al menos 6 semanas para disminuir posteriormente hasta niveles no detectables a partir de los 300 días p.i. (Loemba *et al.*, 1996; Vézina *et al.*, 1996). La corta duración de las IgMs hace que se puedan utilizar para diferenciar las infecciones agudas y crónicas, mientras que la cinética de las IgGs hace que no se puedan utilizar para detectar en qué momento de la infección se encuentra el animal. Por otra parte, en los estudios realizados para determinar la presencia de anticuerpos neutralizantes se concluyó que son anticuerpos de aparición tardía, de forma que no se pueden detectar hasta los días 51-70 p.i. (Nelson *et al.*, 1994). En estudios posteriores se ha observado que se pueden detectar con títulos bajos ($<1:8$) a partir de las 3-4 semanas p.i. (Vézina *et al.*, 1996), e incluso a partir del día 11 p.i., realizando una modificación en la técnica de seroneutralización (SN) (Yoon *et al.*, 1994a). El título de estos anticuerpos van aumentando hasta el día 127 p.i., momento en que alcanzan su pico máximo para disminuir a continuación hasta niveles no detectables en el día 262 p.i. (Nelson *et al.*, 1994).

Si lo que se estudia es la producción de anticuerpos frente a las distintas proteínas del virus, se ha demostrado la presencia de anticuerpos específicos frente a las proteínas M y N a partir de la segunda semana p.i. (Loemba *et al.*, 1996) y a partir de la sexta semana p.i. se pueden detectar en el suero de animales convalecientes anticuerpos frente a las proteínas codificadas por las ORFs 3, 4, 5, 6 y 7, aunque son mayoritarios los dirigidos frente a las proteínas codificadas por las ORFs 6 y 7 (proteínas M y N respectivamente) (van Nieuwstadt *et al.*, 1995).

Aunque, según se ha indicado anteriormente, la duración de los anticuerpos en el suero de los animales que han pasado la infección puede ser de hasta prácticamente un año, se ha demostrado que a los 6 meses de un brote una tercera parte de los animales son negativos (Robert *et al.*, 1993).

Introducción

Los lechones nacidos de cerdas infectadas pueden no presentar anticuerpos en el momento del nacimiento, siendo positivos antes del destete por la inmunidad pasiva conferida por su madre, de forma que se ha podido establecer una correlación entre el título de anticuerpos de la madre y el título de los lechones a las dos semanas de vida (Houben *et al.*, 1995b). A pesar de que no se ha esclarecido el papel que juegan los anticuerpos en la infección por el virus, ya que conviven ambos en el suero de los animales enfermos, se ha demostrado que los lechones que maman calostro de cerdas inmunes están protegidos frente a la infección (Molitor, 1993). Sin embargo, no se consigue el mismo efecto cuando se administran anticuerpos únicamente, sugiriendo la importancia que puede tener la inmunidad de base celular (Molitor, 1993). Además, existe controversia en este punto ya que la protección que se consigue no es total de forma que administrando mayor número de $DI_{50}CT$ a los animales con inmunidad maternal, éstos se pueden infectar (Morrison *et al.*, 1996). Por otra parte, se ha demostrado que el virus eliminado por lechones infectados *in utero* puede transmitirse a otros lechones de la misma camada, aunque mamen el calostro de su madre (Joo y Park, 1996), siendo estos lechones susceptibles a la infección con una nueva cepa. Estos hallazgos indican que no siempre se produce una protección maternal por la ingestión de calostro, quizá debido al desarrollo de una inmunidad insuficiente en las cerdas durante el periodo de tiempo transcurrido entre la infección y el parto si ésta sucede al final de la gestación (Park y Joo, 1996). Por otra parte, los lechones nacidos virémicos pueden seguir siéndolo hasta las 6-8 semanas de vida, independientemente de la ingestión del calostro (Mengeling *et al.*, 1994; Bøtner *et al.*, 1994).

Aunque, dado que la presencia de anticuerpos puede favorecer la multiplicación del virus, se ha planteado la posibilidad de que este fenómeno pueda suceder en los lechones que han recibido una inmunidad pasiva cuando ésta cae por debajo de los niveles protectores (Yoon *et al.*, 1994b), se ha comprobado, en las granjas donde circula el virus, que los lechones no se infectan hasta que desaparece la inmunidad maternal y que los lechones nacidos de madres infectadas presentan una sintomatología clínica más grave cuando no presentan niveles detectables de anticuerpos (Albina *et al.*, 1994; Morrison *et al.*, 1996). Los anticuerpos maternos disminuyen rápidamente tras el destete, alcanzando un mínimo a partir de las 4 semanas de vida, momento en el que, en las granjas donde está circulando el virus, se infectan los lechones, produciéndose la seroconversión entre las 6 y las 12 semanas de vida (Houben *et al.*, 1995b).

En lo que se refiere a la respuesta inmune de base celular, en los primeros experimentos realizados se describió una leucopenia que alcanzaba un pico en el día 7 p.i., detectándose una linfopenia entre los días 3 y 11 p.i. que afectaba tanto a los linfocitos T como a los B y una reducción en el número de monocitos circulantes en el día 7 p.i. para volver a los valores normales en el día 14 p.i. (Christianson *et al.*, 1993). Posteriormente se ha demostrado que la infección por el VSRRP, además de la respuesta inmune de base humoral descrita, da lugar a una respuesta

inmune de base celular específica y dependiente de la dosis, que se puede detectar tanto por una proliferación de linfocitos T como por una reacción de hipersensibilidad retardada, siendo la respuesta proliferativa inducida por la cepa VR-2332 más específica que la inducida por la cepa LV (Bautista *et al.*, 1996b). En estudios realizados *in vitro* se ha demostrado que la respuesta de proliferación de los linfocitos está restringida por el complejo mayor de histocompatibilidad, implicando fundamentalmente a los linfocitos CD4⁺ y que empieza a las 4 semanas p.i. alcanzando un máximo a las 7 semanas y disminuyendo después de 11 semanas p.i. (Bautista *et al.*, 1996b). Sin embargo, en este punto existe cierta controversia ya que en estudios realizados *in vivo* se ha demostrado que se produce una disminución en el número de linfocitos CD4⁺ y CD2⁺ en el día 3 p.i. que en el caso de los CD4⁺ continúa durante al menos 14 días mientras que los CD2⁺ tienden a aumentar posteriormente. Por su parte los CD8⁺ disminuyen ligeramente en el día 3 p.i. y luego aumentan, alcanzando su máximo entre los días 28 y 35 p.i. (Shimizu *et al.*, 1996). Por otro lado, no se han observado diferencias en las subpoblaciones de timocitos, sugiriendo que el virus no modula una diferenciación de linfocitos T en el timo, produciendo, por el contrario, una activación policlonal de los linfocitos de la sangre periférica en los días 7 y 14 p.i. (Vézina *et al.*, 1996).

Por otra parte, existen muchos datos de campo que indican un posible papel inmunosupresor del VSRRP, habiéndose demostrado experimentalmente que la infección por el VSRRP produce una exacerbación de la infección producida por *Streptococcus suis*, *Salmonella choleraesuis*, el coronavirus respiratorio porcino y el virus de la influenza porcina (Galina *et al.*, 1994; van Reeth *et al.*, 1996b; Wills *et al.*, 1997). Sin embargo, existe controversia en este punto, ya que algunos autores han demostrado que la inoculación previa con el VSRRP no produce ninguna diferencia en el desarrollo de síntomas y lesiones en cerdos infectados con *Haemophilus parasuis*, *Streptococcus suis*, *Salmonella choleraesuis*, *Pasteurella multocida* (Cooper *et al.*, 1995; Carvalho *et al.*, 1995), *Mycoplasma hyopneumoniae* (Albina *et al.*, 1995; van Alstine *et al.*, 1996), *Actinobacillus pleuropneumoniae* o el virus de la influenza porcina (Pol *et al.*, 1995). Además, cuando se ha estudiado la respuesta de anticuerpos frente a distintos antígenos (*Brucella abortus* y una vacuna inactivada frente a la enfermedad de Aujeszky) se ha visto que los animales infectados previamente con el VSRRP producen una respuesta mayor que los animales no infectados (Molitor *et al.*, 1992) y presentan mayor resistencia a una inoculación con una cepa virulenta tras la vacunación con vacunas recombinantes, al menos en el caso de la enfermedad de Aujeszky (Albina *et al.*, 1995). Y lo mismo ha sucedido cuando se ha medido la respuesta de base celular, midiendo la respuesta de hipersensibilidad retardada tras la inoculación de dinitrofluorobenceno. En este caso se ha observado una respuesta más alta y más larga en los animales infectados con el VSRRP (Molitor *et al.*, 1992). Por tanto, se puede concluir que la infección por el VSRRP da lugar a una respuesta inmune mayor frente a antígenos específicos (Molitor *et al.*, 1992; Ohlinger *et al.*, 1992a;

Albina *et al.*, 1995) la cual se ha atribuido a una activación policlonal de los componentes de la respuesta inmune similar a la descrita en la infección por el VLD (Molitor, 1993).

Sin embargo, algunos autores han encontrado una mayor susceptibilidad a ciertas infecciones respiratorias como las producidas por el virus de la influenza porcina o el coronavirus respiratorio porcino (Groschup *et al.*, 1993) y la han atribuido al efecto adverso que la infección produce en los macrófagos alveolares, ya que se produce una destrucción de entre un 50% y un 65% de los mismos en un plazo de 7 días p.i., alterándose además la capacidad de liberación del anión superóxido en los macrófagos infectados con lo cual se compromete uno de los principales componentes de la respuesta pulmonar. Esta alteración no es muy larga en el tiempo y en el día 28 p.i. los macrófagos pulmonares han vuelto a recuperar su funcionalidad (Molitor, 1993).

1.9. DIAGNÓSTICO

El diagnóstico de la enfermedad puede basarse en la sintomatología, las lesiones anatomopatológicas a las que da lugar, la detección de anticuerpos frente al virus o la determinación del agente en sí mismo, bien sea por aislamiento o por detección vírica.

1.9.1. Diagnóstico clínico

Es difícil realizar un diagnóstico adecuado basándose en la sintomatología de la enfermedad ya que la forma de presentación de la misma varía mucho de una granja a otra. Además, las infecciones secundarias que suelen acompañarlo dificultan el diagnóstico. Por otra parte hay que tener en cuenta que otras infecciones, tanto víricas como bacterianas, pueden producir una sintomatología similar. Es el caso de las producidas por el virus de la influenza porcina, tanto las cepas típicas como las atípicas, el parvovirus porcino, el virus de la enfermedad de Aujeszky, el virus de la encefalomiocarditis, el coronavirus respiratorio porcino y el citomegalovirus porcino dentro de las infecciones víricas y las producidas por *Leptospira interrogans*, serovariantes *pomona* y *bratislava* entre las bacterianas (Keffaber, 1989; Collins *et al.*, 1991; Brun *et al.*, 1992; Carlson, 1992; Yoon *et al.*, 1996).

Sin embargo, cuando apareció la enfermedad, y antes de que se desarrollaran otras formas de diagnóstico, éste se basaba en la sintomatología y distintas normas fueron establecidas en los distintos países para atribuir un brote al SRRP. Las más populares son las desarrolladas en Holanda, donde consideraban que se debía sospechar de SRRP si, una vez eliminadas todas las otras causas posibles de la enfermedad, se cumplían, en un plazo de dos semanas, al menos 2 de los 3 requisitos siguientes:

Introducción

1. Que el número de lechones nacidos muertos superara el 20%;
2. Que el número de abortos fuera mayor del 8% y
3. Que la tasa de mortalidad en la primera semana de vida alcanzara al menos el 25% (de Jong *et al.*, 1991b).

Sin embargo, sólo los casos más graves de la enfermedad cumplían estos requisitos y, en algunos casos, únicamente un examen exhaustivo de los datos de producción podía demostrar que había existido una infección por el VSRRP (Schukken *et al.*, 1992), de tal forma que en muchos casos la presencia de la enfermedad ha quedado sin confirmar.

1.9.2. Diagnóstico anátomo-patológico

También es muy difícil de llevar a cabo ya que normalmente no se observan lesiones macroscópicas en la necropsia y si se observan se limitan a focos de neumonía intersticial que pueden ser fácilmente enmascarados por las lesiones producidas por otros agentes secundarios. Para el análisis histopatológico se ha recomendado remitir cerebro, corazón, pulmón, bazo, ganglios linfáticos y los cornetes nasales. Como ya se ha mencionado, la lesión más característica aparece en el pulmón y se caracteriza por ser una neumonía intersticial con un engrosamiento de los septos alveolares y la presencia de células mononucleares, fundamentalmente macrófagos. La lesión puede ser observada en cerdos de todas las edades, pero los cerdos más jóvenes son más adecuados para este tipo de diagnóstico, ya que la probabilidad de que exista una infección secundaria es más baja. Una lesión similar a ésta puede ser causada por otros agentes infecciosos como el virus de la influenza porcina (cepas H1N1, H3N2 y cepas atípicas) y el coronavirus respiratorio. En los ganglios linfáticos se observa hipertrofia e hiperplasia de los centros germinales, acompañado de una necrosis folicular y un aumento en el número de macrófagos en los sinusoides. También se observa la aparición de sincitios y de estructuras similares a quistes (Rossow *et al.*, 1994a,b; Halbur *et al.*, 1995a).

Otras lesiones que se han asociado en ocasiones con el SRRP son:

1. Rinitis caracterizada por la pérdida de los cilios en las células epiteliales, vacuolización de las mismas y descamación de la superficie del epitelio.
2. Encefalitis no supurativa caracterizada por el acúmulo perivascular de células mononucleares distribuido por todo el cerebro.
3. Miocarditis multifocal, con un acúmulo perivascular de células mononucleares.

1.9.3. Diagnóstico serológico

Poco después del aislamiento del VSRRP se empezaron a desarrollar técnicas para determinar la presencia de anticuerpos frente a este virus. La primera técnica que se desarrolló fue una técnica de inmunoperoxidasa en monocapa (IPMA) que fue desarrollada en Lelystad y ampliamente utilizada en toda Europa (Wensvoort *et al.*, 1991). Esta técnica se basa en la detección de anticuerpos específicos unidos a MAP previamente infectados con el VSRRP y posteriormente fijados. Fue modificada, adaptándola a la utilización de células de la línea celular CL-2621 para evitar los problemas que da trabajar con cultivos de macrófagos (Frey *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1992). Utilizando esta técnica, aparecen títulos significativos de anticuerpos a los 6 días p.i., alcanzando un pico (títulos de hasta 1:40000) a las 5 ó 6 semanas p.i.. La duración de los mismos puede ser de 1 año aproximadamente, aunque algunos animales son negativos a los 4-6 meses de la infección. La especificidad de la técnica parece ser muy buena (Ohlinger *et al.*, 1991a), sin embargo la sensibilidad no es buena, ya que un 25% de los animales afectados no muestran seroconversión (Wensvoort *et al.*, 1991).

Con la misma frecuencia con que se ha utilizado la técnica de IPMA en Europa ha sido utilizada la de la IFI en EE.UU.. Fue adaptada por Yoon y col. (1992b) y tiene una sensibilidad y una especificidad similares a las de la técnica de IPMA. Los anticuerpos específicos frente al VSRRP se pueden detectar a los 6 días p.i. (Yoon *et al.*, 1992b) y en estudios experimentales se ha determinado que todos los cerdos empleados habían seroconvertido en el día 7 p.i. con títulos de 1:20 y que el pico de anticuerpos se alcanzaba a las 4 semanas de la inoculación con títulos del orden de 1:2560 (Frey *et al.*, 1992; Rossow *et al.*, 1992). Originalmente se utilizaban MAP infectados con el VSRRP, pero posteriormente se ha adaptado el uso de la técnica a la línea celular CL-2621 (Frey *et al.*, 1992; Bautista *et al.*, 1993b). En un estudio realizado en EE.UU. se ha observado que el 71,4% de las muestras procedentes de granjas con una historia clínica de SRRP presentaban títulos de al menos 1:4, mientras que sólo un 1,3% de las muestras procedentes de granjas no afectadas presentaban títulos de esa magnitud (Yoon *et al.*, 1992b). Estudios comparativos han puesto de manifiesto que la técnica de IPMA y la técnica de IFI han dado resultados similares (Fichtner *et al.*, 1994). Recientemente se ha desarrollado una técnica de IFI para la detección de anticuerpos del tipo IgM, haciendo posible así la detección de animales en la fase aguda de la enfermedad (Park *et al.*, 1995). Estos anticuerpos se pueden detectar a partir del día 5 y hasta los días 28 a 63 p.i. según los distintos autores (Park *et al.*, 1995; Loemba *et al.*, 1996; Vézina *et al.*, 1996).

También se ha adaptado la técnica de la SN para detectar anticuerpos neutralizantes desarrollados frente a este virus. No se puede realizar en cultivos de MAP ya que los anticuerpos

Introducción

median la opsonización del virus por los macrófagos, dando lugar a un aumento en la replicación del virus, en lugar de a una neutralización (Choi *et al.*, 1992). Sin embargo, sí se puede realizar si se usan las líneas celulares en las que se puede replicar el virus *in vitro* (MA-104 y CL-2621) (Benfield *et al.*, 1992b). Los anticuerpos neutralizantes no se detectan hasta las 6-8 semanas p.i., por lo cual esta técnica no se ha considerado lo suficientemente sensible como para ser utilizada en infecciones tempranas (Christopher-Hennings *et al.*, 1992; Frey *et al.*, 1992) y además a los 2 meses de la infección muchos de los sueros son negativos. Posteriormente se ha realizado una modificación de la misma de forma que, si se realiza en el clon MARC-145 de la línea celular MA-104 con una suplementación de suero porcino seronegativo, a una concentración final del 20%, se aumenta la sensibilidad y se pueden detectar anticuerpos a partir del día 11 p.i. y durante un periodo de tiempo más largo que con la técnica de IFI. Este fenómeno se explica posiblemente por el hecho de que la neutralización temprana se estimula por la presencia del complemento, que aporta el suero porcino añadido, ya que los anticuerpos tempranos pueden tener una baja afinidad de unión al virus o una baja capacidad de neutralizar la infectividad vírica (Yoon *et al.*, 1994a). Esta técnica es especialmente útil en los estudios serológicos de granjas donde ya ha pasado la infección primaria, siendo poco adecuada para la detección de los casos agudos.

Investigadores franceses y españoles, en un proyecto de colaboración, elaboraron la primera técnica inmunoenzimática (ELISA) para la detección de anticuerpos frente al VSRRP que ha sido utilizada de forma rutinaria en Francia. Es una técnica indirecta que utiliza un antígeno preparado en cultivos de MAP. Cada suero se enfrenta a dos antígenos (positivo y negativo) con el fin de detectar reacciones inespecíficas. La sensibilidad, especificidad y concordancia comparada con la técnica de IPMA son 1; 0,72 y 0,85 para sueros individuales y 1; 0,89 y 0,94 para granjas, respectivamente (Albina *et al.*, 1992c; Albina y Buffereau, 1993). Aunque estos autores han afirmado que esta técnica tiene mayor sensibilidad que la técnica de referencia (IPMA), en particular para animales que están seroconvirtiendo, y que su especificidad es muy alta, hay autores que opinan que la sensibilidad es menor que la de IPMA (Edwards *et al.*, 1992). Esta técnica de ELISA detecta anticuerpos a partir de las 2 semanas p.i. y tiene la ventaja de ser más barata y sencilla de realizar que la técnica de IPMA.

En la actualidad se han desarrollado técnicas de ELISA en distintos laboratorios, tanto directas como indirectas, de bloqueo o utilizando proteínas víricas expresadas en baculovirus para tapizar las placas. Además se han desarrollado técnicas que permiten la detección de IgM para diagnosticar infecciones tempranas y poder distinguir infecciones agudas y crónicas (Edwards *et al.*, 1992; Blaha *et al.*, 1995; Houben *et al.*, 1995a). Una de las técnicas desarrolladas utiliza un antígeno vírico obtenido en la línea celular MARC-145, solubilizado con triton X-100 para evitar las reacciones de fondo que aparecían debido al tipo de antígeno utilizado para tapizar las placas. La

Introducción

especificidad y la sensibilidad de esta técnica son del 100% y el 96,6% si se compara con la técnica de IFI (Cho *et al.*, 1996). También se ha desarrollado una técnica de ELISA de bloqueo en fase líquida utilizando anticuerpos monoclonales desarrollados frente a la cepa de referencia del virus italiana (Cordioli *et al.*, 1996). En Bélgica utilizan para la detección de anticuerpos frente al VSRRP una técnica de ELISA de bloqueo que utiliza un antígeno unido a la placa mediante un anticuerpo de captura (Houben *et al.*, 1995a).

El intenso trabajo llevado a cabo en el desarrollo de técnicas de ELISA que faciliten el diagnóstico serológico de la enfermedad ha hecho que existan actualmente en el mercado ELISAs que permiten la detección de anticuerpos frente a este virus. Las dos más conocidas son una técnica ELISA comercializada por IDEXX® que es una técnica indirecta que utiliza antígenos de cepas europeas y americanas para tapizar las placas, asegurando así la detección de anticuerpos desarrollados frente a cualquiera de los tipos antigénicos, cuya sensibilidad oscila entre 0,68 y 0,91 y la especificidad entre 0,75 y 0,97 (Nodelijk *et al.*, 1996b) y una técnica de ELISA comercializada por Ingenasa (Ingezim PRRS®) que utilizaba en un principio como antígeno una proteína vírica recombinante (producto de la ORF 7) expresada en un sistema de baculovirus. La sensibilidad y especificidad de la técnica comparada con la técnica de IPMA era del 84% y del 94% respectivamente pero presentaba el problema de presentar reacciones inespecíficas (Drew, 1995). Para mejorar la sensibilidad y especificidad se han obtenido anticuerpos monoclonales desarrollados frente a la nucleocápside del virus y se ha desarrollado una ELISA de bloqueo que es capaz de detectar anticuerpos desde el día 10 hasta, al menos, el día 210 p.i. (Sanz *et al.*, 1995).

Estudios realizados comparando distintas técnicas de diagnóstico, incluyendo IPMA, IFI y distintas ELISAs han dado como resultado una buena especificidad en general, siendo la más sensible la de IPMA realizada sobre cultivos de MAP, igualada solamente por una ELISA de bloqueo utilizada en Bélgica (Drew, 1995; Yoon *et al.*, 1995c). La primera detecta anticuerpos 2 ó 3 días antes que la segunda y es más sensible en la detección de anticuerpos maternos, mientras que la segunda tiene mayor sensibilidad en la detección de anticuerpos frente a cepas americanas (Nodelijk *et al.*, 1996b).

Las pruebas serológicas pueden dar problemas teniendo en cuenta la variación antigénica del VSRRP (Beilage *et al.*, 1992; Frey *et al.*, 1992; Wensvoort *et al.*, 1992; Bautista *et al.*, 1993b; Yoon *et al.*, 1995a) como se ha puesto de manifiesto cuando se ha sometido a pruebas de IFI y de SN a sueros británicos positivos por la técnica de IPMA (Edwards *et al.*, 1992). Entre las cepas aisladas en los distintos países europeos no existen diferencias sustanciales (Wensvoort *et al.*, 1992; Kapur *et al.*, 1996; Suárez *et al.*, 1996b;), pero sí entre las cepas europeas y las americanas (Wensvoort *et al.*, 1992) y entre las distintas cepas americanas (Wensvoort *et al.*, 1992). Como

consecuencia, para la detección de anticuerpos frente al VSRRP se recomienda la utilización de técnicas desarrolladas y validadas en la zona donde se encuentran los animales que se van a estudiar para evitar este tipo de problemas.

Además, teniendo en cuenta la gran extensión que presenta hoy en día la enfermedad, una toma de sangre no es suficiente para determinar si la infección ha sido reciente o no, por lo que se necesitan muestras pareadas siempre que se realice un estudio de presencia de anticuerpos. Una muestra de 30 animales ofrece un nivel de confianza del 95% para detectar una seroprevalencia del 10% ó mayor (Dea *et al.*, 1992c). Si la prevalencia es mayor, lo cual es muy frecuente si se están estudiando cerdos de cebadero, será suficiente una muestra de 10 animales, que permite detectar con un nivel de confianza del 95% una seroprevalencia del 30% ó mayor (Morrison *et al.*, 1992a). La mayoría de los lechones seroconvierten en las lechoneras, de forma que animales de 3-4 meses de edad son un buen indicador de la presencia de la enfermedad (Thacker, 1992). Así, en granjas en que la enfermedad es endémica, la mayoría de los lechones son negativos cuando se destetan, pero entre el 80% y el 100% de los animales han seroconvertido a las 8 ó 10 semanas de vida (Freese y Joo, 1994). Por el contrario, la mayoría de las cerdas en este tipo de granjas son seronegativas (Stevenson *et al.*, 1994). Además es frecuente detectar anticuerpos en lechones que nacen infectados, siendo también posible que estos anticuerpos convivan con el virus circulante. Por tanto, la infección transplacentaria se puede demostrar no sólo por la existencia del virus sino también de anticuerpos específicos en la sangre de los lechones antes de mamar el calostro y en el líquido ascítico de los lechones nacidos muertos o nacidos débiles (Terpstra *et al.*, 1991; Christianson *et al.*, 1992).

1.9.4. Determinación del VSRRP

Para la determinación del virus se puede intentar su aislamiento o bien su detección.

1.9.4.1. Aislamiento vírico

El aislamiento vírico constituye una técnica diagnóstica muy importante, pero poco utilizada debido a la infraestructura necesaria para llevarla a cabo. Es posible aislar el virus de varios órganos y tejidos incluyendo el pulmón, la médula ósea, el bazo, el timo, las amígdalas, los ganglios linfáticos, el corazón, el cerebro, el hígado y el riñón, aunque la muestra que ha resultado ser más adecuada para el aislamiento es el suero de animales enfermos (van Alstine *et al.*, 1993), los líquidos fetales y el pulmón de los fetos, el suero o los órganos linfoides (Bloemraad *et al.*, 1994) y los MAP recogidos mediante lavado pulmonar (Mengeling *et al.*, 1995). El uso de MAP proporciona una ventaja ya que, además de su utilización para el aislamiento vírico a partir de

Introducción

lisados de los mismos, pueden ser utilizados para la detección de antígenos víricos mediante una técnica de IFI 1 hora después de ser añadidos al soporte de cultivo, dando por tanto un diagnóstico muy rápido. Además, es posible la utilización de MAP procedentes de animales vivos, los cuales han demostrado dar resultados positivos durante periodos de tiempo más prolongados que las muestras de suero (9 semanas p.i. frente a 4 semanas p.i.). En este caso los mejores resultados se han obtenido realizando cocultivos de MAP con células de la línea celular MARC-145 (Mengeling *et al.*, 1996c). Si lo que se observan son problemas asociados a la reproducción, la mejor muestra la constituyen lechones nacidos muertos o nacidos débiles, especialmente el suero de estos animales.

Se ha demostrado que, aunque el virus se puede aislar hasta 8 semanas después de la infección del pulmón, el suero, el plasma o las células sanguíneas (Ohlinger *et al.*, 1992a; Paton *et al.*, 1992), las muestras procedentes de animales en la fase aguda de la enfermedad son más recomendables.

En cualquier caso, las muestras empleadas deben estar frescas, ya que los procesos de autólisis inactivan rápidamente el virus (Boeckman, 1993). Ésta puede ser la causa de que los fetos momificados no sean una buena muestra para intentar el aislamiento vírico (Christianson *et al.*, 1992).

En el laboratorio el virus se puede cultivar en MAP obtenidos por lavado pulmonar (Wensvoort *et al.*, 1991) o en líneas celulares establecidas procedentes de riñón de mono (CL-2621 y MA-104) (Benfield *et al.*, 1992a,b; Kim *et al.*, 1993). Sin embargo, algunos aislados crecen solamente en alguno de los tipos celulares, con más frecuencia en MAP, sobre todo si se intenta realizar el aislamiento a partir de muestras de suero, por lo que se recomienda la utilización de ambos tipos de células (Bautista *et al.*, 1993b). El ECP producido por el virus ha sido descrito por Pol *et al.* (1992) y Paton *et al.* (1992a) y consiste en un redondeamiento y agrupamiento de las células, seguido del desprendimiento del soporte en que se cultivan como consecuencia de la muerte celular. El virus altera la homeostasis celular haciendo que desaparezcan las proyecciones de superficie de las células.

Sin embargo, las cepas de campo presentan grandes variaciones en sus características de cultivo, produciendo algunas un ECP obvio a los 3 ó 4 días de cultivo y necesitando otras tres pases en un periodo de 3 a 4 semanas para ponerlo de manifiesto. También se han descrito aislados que no producen ECP de tal manera que es necesario realizar tinciones inmunológicas para determinar su presencia. Entre las tinciones utilizadas están la inmunofluorescencia directa (IFD) (Yoon *et al.*, 1992b), la IPMA (Wensvoort *et al.*, 1991) y una tinción con oro coloidal (Magar *et*

al., 1993).

1.9.4.2. Detección vírica

Los métodos de detección vírica incluyen tinciones inmunológicas que se han utilizado para determinar la presencia del virus en cortes histológicos de tejidos como el pulmón o el bazo. Éstas incluyen técnicas de inmunofluorescencia directa en cortes de pulmón o bazo utilizando anticuerpos monoclonales conjugados con fluoresceína (Benfield *et al.*, 1992a; Nelson *et al.*, 1992), las cuales han demostrado ser útiles en el diagnóstico de la enfermedad cuando se asocia a problemas reproductivos (Zeman *et al.*, 1993), técnicas de inmunoperoxidasa en tejidos fijados con formalina o solución de Bouin (Halbur *et al.*, 1994a), con las que se observa una tinción específica en el citoplasma de las células infectadas y técnicas de inmunohistoquímica (Magar *et al.*, 1993), que ofrecen la ventaja de permitir evaluar a la vez la presencia de antígenos víricos y las lesiones histológicas, además de permitir la realización de estudios retrospectivos utilizando tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina (Larochelle *et al.*, 1994). La sensibilidad de este tipo de técnicas es comparable a la obtenida utilizando técnicas de inmunoperoxidasa, sin embargo, las reacciones inespecíficas son mucho menos frecuentes (Larochelle y Magar, 1995).

Igual que sucede con las técnicas de inmunohistoquímica, la hibridación *in situ* también permite la detección y localización del virus en las células y los tejidos afectados. La diferencia es que en este último caso se detectan los ácidos nucleicos específicos del virus. Recientemente se ha descrito una técnica de hibridación *in situ* que utiliza como marcador para la detección del virus en muestras de tejidos fijados con formalina y embebidos en parafina la digoxigenina (Larochelle *et al.*, 1996). Esta técnica ha demostrado ser más sensible que la inmunohistoquímica, ofreciendo una sensibilidad similar a la obtenida mediante el aislamiento vírico, pero con la ventaja de ser más rápida y sencilla de realizar (Larochelle y Magar, 1996). Otra posibilidad es realizar una técnica de hibridación *in situ* utilizando como marcador la biotina (Park *et al.*, 1996b).

Además se ha desarrollado la técnica de la transcripción inversa y la reacción en cadena de la polimerasa (RT-PCR) para la detección del virus, tanto en el laboratorio como para muestras clínicas, incluyendo muestras de semen (Mardassi *et al.*, 1994c; Suárez *et al.*, 1994; van Woensel *et al.*, 1994; Christopher-Hennings *et al.*, 1995b; Shin *et al.*, 1996b). La primera técnica de RT-PCR fue la desarrollada por Suárez *et al.* (1994). Esta técnica amplifica un fragmento de ADN que corresponde a una secuencia determinada de la ORF 7 del ARN del virus Lelystad. Los primeros cebadores diseñados, de 28 oligonucleótidos cada uno, definen un segmento amplificado de 312 pares de bases entre las bases 14639 y 14950. Este amplicón se detecta como una banda en un gel de agarosa al 1,5% teñido con bromuro de etidio. La sensibilidad obtenida en sobrenadantes de

cultivos de MAP infectados con el VSRRP es de 6,7 $DI_{50}CT$ y en muestras clínicas de 102 $DI_{50}CT$. La técnica desarrollada por van Woensel *et al.* (1994) detecta hasta 30 $DI_{50}CT$ en sobrenadantes de cultivos de MAP o en muestras de semen. La técnica desarrollada por Christopher-Hennings *et al.* (1995b) utiliza dos grupos de cebadores, uno de ellos corresponde a un fragmento de la ORF 1b y el otro corresponde a un fragmento de la ORF 7. Esta técnica, utilizada fundamentalmente para la detección del virus en muestras de semen, permite la detección del 10 viriones/mL y ha demostrado tener muy buena correlación con el bioensayo, obteniéndose el mismo resultado en el 94% de los casos. La técnica desarrollada por Mardassi *et al.* (1994c) permite la diferenciación de cepas europeas y canadienses ya que utiliza dos pares de cebadores, uno general que reconoce una zona conservada y otro que no reconoce las cepas europeas. Por último, la técnica descrita por Shin *et al.* (1996b) es una técnica múltiple que permite detectar la presencia del virus de la enfermedad de Aujeszky, el coronavirus respiratorio porcino y el VSRRP en muestras de semen. La sensibilidad para la cepa americana VR-2332 es de 0,01 $DI_{50}CT$ y para la cepa europea LV es de 0,1 $DI_{50}CT$. Además de las técnicas de RT-PCR, se ha desarrollado una técnica de ELISA-PCR que marca los productos de PCR con digoxigenina durante su obtención, para después hibridarlos utilizando una sonda marcada con biotina que es revelada mediante una técnica de ELISA (Valícek *et al.*, 1996).

Otra forma de detección vírica son los bioensayos, consistentes en la inoculación de muestras sospechosas de contener virus a lechones seronegativos de entre 4 y 8 semanas de vida y observar si se produce una seroconversión, prueba de que la muestra era positiva. Se ha utilizado principalmente para detectar la presencia de virus en muestras de semen (Swenson *et al.*, 1994a,b; Christopher-Hennings *et al.*, 1995b; Nielsen *et al.*, 1995) inoculando a lechones por la vía intraperitoneal. Tiene como ventajas el ser muy sensible y detectar virus infectivo y como inconveniente el ser una prueba cara y larga.

1.10. TRATAMIENTO

No existe un tratamiento específico para la enfermedad y lo único que se puede hacer es aplicar medidas paliativas.

Los cerdos que muestran una sintomatología respiratoria deben ser alojados en naves en las que haya una buena calidad de aire, donde no existan corrientes, evitando la mezcla de animales y la superpoblación para evitar en lo posible el estrés. Además es conveniente subir la temperatura media de la sala (Muirhead, 1992). Se ha descrito una disminución en los efectos que produce la enfermedad cuando las condiciones ambientales y de alojamiento son buenas y cuando la densidad

Introducción

de animales no es muy alta (White, 1992). Se deben dar alimentos de buena palatabilidad y alta energía a todos los animales afectados para evitar, en la medida de lo posible, la pérdida de condición corporal durante el periodo de inapetencia (White, 1991).

Los antibióticos se han utilizado, bien por la vía parenteral o bien en el agua o el pienso, para controlar las infecciones secundarias (Hopper *et al.*, 1992). Muirhead (1992) ha recomendado añadir tetraciclina al pienso de gestación durante 4 semanas, furazolidona al pienso de lactación e inyectar a los lechones con antibióticos de larga duración a los 3, 6 y 9 días de edad, además de dar tetraciclinas, sulfonamidas o tilosina durante 3 ó 4 semanas a los cerdos en crecimiento.

También se han aplicado antiinflamatorios, especialmente ácido acetilsalicílico, salicilatos, flunixin y dipirona (Ahl *et al.*, 1992; Gordon, 1992; White, 1992). El ácido acetilsalicílico se ha utilizado a la dosis de 8 g/cerda/día durante 7-10 días, pero debe ser usado con precaución porque los salicilatos son teratogénicos al principio de la gestación. Tanto los salicilatos como otros fármacos se han utilizado por su efecto anti-prostaglandínico para evitar los abortos y los nacidos muertos con resultados variables.

Para reducir la mortalidad perinatal se ha intentado asegurar que los lechones ingieran el calostro en el momento del nacimiento y a las 4 horas, además de darles electrolitos, glucosa y calostro natural o artificial. Además se debe intentar que las condiciones en el nido sean adecuadas para que los lechones estén confortables. También se ha administrado suero de animales que se han recuperado de la enfermedad obtenido en el matadero para conseguir una buena inmunidad pasiva, pero los resultados han sido, al menos, dudosos.

Como medida para reducir el estrés en los lechones recién nacidos se ha propuesto evitar el corte de los colmillos, especialmente en los lechones nacidos débiles, y retrasar la inyección de hierro hasta los 3 días de edad y el corte de la cola, si se realiza, hasta los 5 días (Ahl *et al.*, 1992; White, 1992). Por su parte Kavanagh (1992) ha sugerido retrasar la inyección de hierro hasta los 14 días de edad y la suspensión de lámparas a ambos lados de la parte posterior de la jaula de partos para mejorar el ambiente del neonato. También se debe realizar una hemostasia en el cordón umbilical para evitar las hemorragias que en ocasiones se han descrito asociadas a esta enfermedad. Es importante evitar la inducción de los partos y los acoplamientos de los lechones sólo se deben realizar en las primeras 24 horas de vida para igualar el tamaño de las distintas camadas, evitando cambiarlos de sala de partos (McCaw, 1995).

Las cerdas que abortan o pierden toda la camada se deben dejar sin cubrir hasta el momento en que deberían ser cubiertas en condiciones normales para evitar tanto los problemas de

Introducción

infertilidad que se presentan en el primer celo después de un aborto o un parto prematuro como los problemas de flujo de animales en la granja. Además, si se presentan problemas de repeticiones, se deben aumentar en un 10% ó un 15% las cubriciones semanales para intentar mantener constante el número de partos por semana (Muirhead, 1992). Por tanto, para conseguir este objetivo se debe intentar rebajar el número de cerdas de desecho que se eliminan en la granja durante la fase aguda de un brote.

Para mitigar los problemas de infertilidad que se pueden presentar en los verracos se debe recurrir a la inseminación artificial o al menos a utilizar distintos verracos en cada monta que se les da a las cerdas para reducir el riesgo de repeticiones.

En granjas persistentemente infectadas, donde aparecen infecciones secundarias en lechonerías y cría de forma continua, se puede intentar la repoblación con animales libres de la infección, siempre y cuando la granja esté situada en una zona donde el riesgo de reinfección sea bajo.

1.11. PREVENCIÓN Y CONTROL

1.11.1. Profilaxis higio-sanitaria

Como medidas de prevención para evitar la entrada del virus en una granja, hay que extremar las precauciones, respetando los periodos de cuarentena, restringiendo el acceso de visitantes a la granja, imponiendo un cambio de ropa obligatorio a la entrada de las instalaciones y evitando la entrada de vehículos dentro del perímetro de las mismas. Estas precauciones parecen haber surtido efecto en algunos países como Bélgica y El Reino Unido, pero no han conseguido frenar la extensión de la infección en otros como es el caso de Holanda. Incluso granjas cerradas, con medidas de seguridad tales como la ducha obligatoria y el cambio de ropa antes de entrar en las instalaciones, han sido infectadas, probablemente debido a la difusión aerógena del virus, especialmente en áreas donde la densidad de población de cerdos es muy alta y las condiciones atmosféricas favorables.

Teniendo en cuenta la posibilidad de difusión aerógena del virus, para la construcción de nuevas granjas, se deben elegir zonas de una baja densidad de animales, lo más lejos posible de granjas que ya estén funcionando, especialmente las más grandes. El riesgo de infección debido a la difusión local de la enfermedad disminuye al aumentar la distancia, con distancias de menos de 3 km especialmente peligrosas, y disminuir la densidad de población (Blaha y Búker, 1995).

Introducción

En muchos casos, la entrada de la enfermedad en una explotación se ha debido a la introducción bien de animales destetados o bien de cerdas de renuevo. Estas cerdas de 6 ó 7 meses de edad, si proceden de granjas que estén infectadas de forma enzoótica, pueden ser virémicas cuando ingresan en la nueva granja (Dee *et al.*, 1993). Además, las pruebas serológicas en las granjas de procedencia no siempre aseguran el estado real de las mismas ya que algunos animales pueden ser negativos, aunque exista la infección en la granja, especialmente si ésta ha sido enzoótica durante algún tiempo, si la infección está en periodo de incubación o si se ha producido después de la extracción de sangre. Como consecuencia, se deben realizar siempre dos pruebas serológicas, una antes del movimiento de los animales y la otra después, al final del periodo de cuarentena en la granja que los recibe. Si los animales permanecen seronegativos al final de ese periodo se puede asumir el riesgo de introducirlos en la explotación, ya que sólo los animales en periodo de incubación son seronegativos. Las muestras pareadas son imprescindibles en el caso de que algunos animales estén infectados, ya que nos permiten conocer, mediante la seroconversión o el aumento de los títulos de anticuerpos, la actividad del virus en ese grupo. Por otra parte, al no ser seropositivos todos los animales de una granja infectada, no son significativos los datos obtenidos en individuos aislados, de forma que se deben analizar muestras de un grupo de individuos que estén en íntimo contacto unos con otros.

Si por el contrario la explotación presenta un *status* serológico positivo y se van a introducir cerdas de renuevo seronegativas, éstas se deben introducir con 3 ó 4 meses de edad para que se infecten en el periodo de crecimiento y evitar la presentación de problemas en la reproducción al infectarse después de la cubrición. Si no se realiza una buena aclimatación pueden aparecer problemas reproductivos crónicos (Dee y Joo, 1994b). Si no se conoce con certeza cuál es la situación de la granja, es una medida muy recomendable el someter a los animales que llegan a un periodo de cuarentena y luego exponerlos a lechones que estén en las lechoneras.

Otra posible fuente de infección la constituyen el semen, los embriones y los fetos obtenidos por histerectomía. Aunque los embriones y los fetos se pueden infectar *in utero* ya que el virus es capaz de atravesar la barrera placentaria, no constituyen un peligro real, ya que no es una práctica habitual ni el transplante de embriones ni la obtención de animales por histerectomía. Por el contrario la adquisición de semen contaminado sí puede constituir un riesgo importante ya que, aunque existe cierta controversia al respecto, se ha demostrado tanto la eliminación de virus por el semen (Swenson *et al.*, 1994a; Christopher-Hennings *et al.*, 1995a) como la transmisión a cerdas inseminadas con semen que contiene el virus (Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1995a; Gradil *et al.*, 1996; Lager *et al.*, 1996b).

Otra cuestión a tener en cuenta es la introducción de verracos en los centros de

Introducción

inseminación artificial. Se puede decir que se deben tener en cuenta los mismos principios que cuando se introducen cerdas de renuevo en una granja respetando los periodos de cuarentena y realizando pruebas serológicas durante al menos 60 días, asegurando así que los animales que se van a introducir son seronegativos (Benfield *et al.*, 1995). Sin embargo, se ha demostrado que, con un periodo de cuarentena adecuado, es posible introducir verracos seropositivos en un centro de inseminación artificial o en una granja sin que exista un peligro real para los animales seronegativos que ya están en el centro o en la granja (Potter, 1994; Paton y Drew, 1995).

Cuando la prevalencia de la enfermedad en una zona en concreto es muy baja, la extensión de la enfermedad se puede controlar mediante un programa de control aplicado al movimiento de animales, a la inseminación artificial y al movimiento de vehículos (le Potier *et al.*, 1995).

También existen una serie de medidas generales, aplicables a cualquier enfermedad infecciosa, que deben ser tenidas en cuenta para evitar la entrada de la enfermedad en las granjas. Entre ellas están el hecho de que el riesgo de introducir cualquier enfermedad en una granja es mayor cuantas más veces se introduzcan animales y cuantos más orígenes se mezclen. Como consecuencia, es preferible introducir más animales de cada vez y con menos frecuencia, intentando que todos tengan la misma procedencia.

Además, la introducción de animales susceptibles a la enfermedad (centinelas) y la vigilancia clínica de los mismos durante el periodo de cuarentena de los animales que llegan a la granja puede ayudar a detectar la presencia del virus.

La limpieza de los locales y el uso de desinfectantes es una medida necesaria. Así, se ha demostrado que los efectos clínicos de la enfermedad son mínimos cuando se desinfecta regularmente (Plana Durán *et al.*, 1992a). Se ha demostrado que el VSRRP es sensible a distintos tipos de desinfectantes, entre ellos una mezcla de peróxido, surfactantes y ácidos orgánicos e inorgánicos (Virkon S®, Antec International), que puede ser utilizado a una dilución 1:700 y una mezcla de ácidos orgánicos, surfactantes y biocidas (Farm Fluid S®, Antec International), que es eficaz a una dilución 1:900.

Si la enfermedad está presente en una granja, existen una serie de medidas de control que se pueden tomar para intentar librarla de la misma. Para ello es fundamental conocer dónde es activo el virus. Existen 4 zonas en una granja donde puede circular el virus:

1. La zona donde se encuentran los animales de reposición (en periodo de aclimatación).
2. Población de reproductores que nunca han tenido contacto con la enfermedad.

3. Las lechoneras.

4. Los cebaderos, especialmente cuando los animales tienen 18 ± 2 semanas (Polson, 1996).

Si la circulación del virus está muy extendida entre los distintos grupos, una posibilidad es la repoblación con animales seronegativos. Para ello se debe vaciar la granja, lavar con agua a presión a más de 94°C , desinfectar con formaldehído tres veces y dejarla en periodo de vacío sanitario durante 14 días (Dee *et al.*, 1993). Esta medida puede ser útil siempre y cuando la granja se encuentre en una zona donde el riesgo de reinfección sea muy bajo.

Existen otras medidas de control que se pueden implantar, sin embargo, para ello es necesario comprobar que el virus no está circulando en los reproductores, ya que ninguna medida, salvo la repoblación, surtirá efecto si los animales adultos están eliminando el virus, infectándose unos a otros y a sus lechones (Dee *et al.*, 1996a). Para comprobar si los animales adultos están eliminando el virus es necesaria la realización de perfiles serológicos (Dee y Joo, 1996). Títulos muy altos de anticuerpos en las cerdas o en los lechones recién destetados pueden indicar que el virus está circulando, sobre todo si la seroprevalencia es mayor del 20%. La circulación del VSRRP en los reproductores se puede controlar mediante el manejo de las cerdas de reposición. Para ello se deben tomar dos tipos de medidas (Dee *et al.*, 1994):

1. Cerrar la granja, evitando la introducción de nuevos animales durante un periodo de al menos 4 meses, para lo cual se pueden utilizar animales del cebadero para la renovación o se pueden introducir los animales de reposición de los 4 meses a la vez, en lugar de seguir un programa semanal o mensual, adaptando para ello las instalaciones.

2. Adecuar las instalaciones para facilitar el periodo de aislamiento y aclimatación de los animales de reposición que entren en la granja. Las instalaciones de aislamiento deben estar fuera de la granja y, si ello no fuera posible, deben al menos tener espacios aéreos separados del resto de los animales que se encuentran en producción. El periodo de aislamiento y aclimatación debe durar de 25-30 días a 45-60 ya que los periodos de viremia son muy largos en esta enfermedad. Además el manejo de la reposición debe seguir el sistema de "todo dentro-todo fuera", limpiando y desinfectando entre los distintos grupos. Durante este periodo de tiempo se deben realizar dos tomas de sangre con un intervalo de entre 30 y 60 días.

Una vez controlada la circulación del virus entre los reproductores, y, si se sabe que el virus está circulando en un grupo concreto de edad, una posibilidad es realizar una depopulación parcial que consiste en una modificación temporal del flujo de animales, sacando de la granja el grupo de edad en el que se cree que circula el virus para limpiar, desinfectar y dejar unos días en periodo de "vacío sanitario" las instalaciones en las que se alojan. El protocolo que hay que seguir

Introducción

para llevar a cabo una depopulación parcial es el siguiente:

1. Se deben sacar de la granja los animales en los que circula el virus, los cuales no deben volver a entrar en el sistema en ningún momento de su ciclo de producción.
2. Se deben lavar y desinfectar las instalaciones 3 veces con agua caliente entre 90°C y 94°C y desinfectantes químicos como el formaldehído o el fenol, todo ello en un periodo de 14 días.
3. Las fosas de purines se deben limpiar y desinfectar entre los ciclos de limpieza y desinfección de las instalaciones.
4. Las habitaciones deben permanecer vacías posteriormente un tiempo mínimo de 2 ó 3 días.

En ocasiones, se ha llevado a cabo sacando de la misma, en una granja de ciclo cerrado, los cerdos en crecimiento y engorde, donde se había demostrado mediante serología que el virus era activo (Kang *et al.*, 1994; Shin *et al.*, 1994). Sin embargo, lo más frecuente es realizar una depopulación parcial de las lechoneras, ya que normalmente es aquí donde se mantiene activo el virus, rompiendo así el ciclo de transmisión de la enfermedad de los animales más viejos a los más jóvenes y conseguir así animales de cebadero negativos a la enfermedad (Dee y Joo, 1994a; Kawashima *et al.*, 1994; Dee *et al.*, 1996c,d). Esta práctica se ha llevado a cabo en granjas donde los perfiles serológicos indicaban seroprevalencias menores del 10-20% en los animales en gestación y en lechones de 3-4 semanas, de entre 25% y 50% en cerdos de 5-6 meses y mayores del 80% en los animales de 8 a 10 semanas de vida (Dee y Joo, 1994a). Este sistema se ha empleado en EE.UU., Europa y Asia y, aunque no es eficaz en la erradicación de la enfermedad en todos los casos, sí consigue que mejoren los datos de producción en las lechoneras, disminuyendo la mortalidad y los costes por tratamientos de enfermedades secundarias y aumentando la ganancia media diaria de peso mejorando por tanto la economía de la mayoría de las granjas (Dee y Joo, 1994a; Dee, 1996a; Dee *et al.*, 1996d). Esta estrategia es especialmente recomendable en zonas con una alta densidad de población, donde es difícil utilizar el sistema de producción en múltiples sitios. Además, tiene las ventajas de ser relativamente barato, de no interrumpir demasiado el flujo de animales y de ayudar a controlar otros patógenos enzoóticos en las granjas como los causantes de la neomonía enzoótica y la enfermedad de Glässer o las infecciones por el coronavirus respiratorio porcino. Como desventajas figuran el hecho de que su aplicación depende del patrón de circulación del virus en la granja y la necesidad de encontrar un sitio para los lechones mientras se lleva a cabo.

En EE.UU. han utilizado los sistemas de Isowean®, el destete precoz segregado, el destete precoz medicado y el destete precoz medicado modificado, unido muchas veces a la utilización de sistemas de producción en múltiples sitios para intentar erradicar la enfermedad en algunas granjas (Dee, 1993; Dee *et al.*, 1993; Christianson *et al.*, 1994a; Loula, 1995). Estos sistemas tienen por

finalidad mantener a los animales por lotes de edades en distintas localizaciones para disminuir la transmisión que de forma natural se produce de los animales más viejos a los más jóvenes. Para que tengan eficacia es necesario que no haya lechones virémicos en lactación, hecho bastante frecuente si el virus no recircula en los reproductores, ya que normalmente lo que sucede es que los lechones tienen anticuerpos maternos que descienden a las 4 semanas de vida aproximadamente para producirse la seroconversión en animales de 6 a 7 semanas de edad. Si se comprueba este hecho, los lechones se pueden destetar cuando aún son jóvenes, muchas veces entre los 12 y los 14 días de vida y trasladarlos a lechoneras construidas fuera de la granja. Al cabo de 12 semanas en este segundo sitio, los lechones se pueden trasladar a cebaderos, ubicados también lejos de las lechoneras, o terminar su ciclo en este segundo sitio. Aunque este sistema puede fallar y se pueden infectar las lechoneras, en cualquier caso el alto nivel sanitario que proporciona este sistema de producción hace que la infección no produzca las pérdidas que produce en los sistemas convencionales (Dee *et al.*, 1993). El destete precoz, acompañado de producción en múltiples sitios, es especialmente adecuado cuando la seroprevalencia en los reproductores es alta (Dee *et al.*, 1993). Además se ha empleado con buenos resultados para eliminar los agentes víricos y bacterianos asociados al SRRP (White, 1995), siempre y cuando estén bien diseñados y se evite la mezcla de animales de distintas edades.

La práctica de un sistema de “todo dentro-todo fuera”, consistente en establecer grupos de animales que tengan todos la misma edad y entren y salgan a la vez a una zona de producción, es fundamental para la erradicación de la enfermedad y es tan importante evitar el movimiento de aire entre las distintas salas como evitar el contacto físico directo entre los animales. Es más, en espacios de aire muy grandes no siempre se obtienen buenos resultados. Además, las salas se deben limpiar y desinfectar entre cada nuevo grupo de animales. Este sistema permite evitar el contacto de los animales más jóvenes con los más viejos, rompiendo de esta forma la recirculación del virus.

Sin embargo, hay que tener en cuenta que, aunque los sistemas de destete precoz segregado, destete precoz medicado, destete precoz medicado modificado, producción en múltiples sitios y “todo dentro-todo fuera” son eficaces para la total eliminación de ciertos patógenos como la enfermedad de Aujeszky o la neumonía enzoótica, no lo son con otros como *Streptococcus suis*, *Haemophilus parasuis* o el SRRP, por lo cual, los resultados obtenidos con este método son variables, sin que se pueda garantizar la eliminación del virus con esta práctica de manejo.

Otro sistema que ha sido descrito para el control de la enfermedad es el denominado MCREBEL (Management Changes to Reduce Exposure to Bacteria to Eliminate Losses) (McCaw, 1995, McCaw *et al.*, 1996). Este sistema está encaminado a reducir tanto los agentes secundarios

Introducción

como el VSRRP en las salas de partos y las lechoneras. Para ello se recomiendan una serie de medidas que a continuación se citan:

1. Realizar acoplamientos sólo en las primeras 24 horas de vida, evitando igualar las camadas cuando algún lechón se quede pequeño o existan animales enfermos, mover los lechones o las cerdas entre distintas salas y el uso de nodrizas para sacar adelante a los lechones enfermos o retrasados.
2. Eliminar los animales enfermos que no tienen posibilidades de recuperación.
3. Evitar el manejo innecesario de los lechones, especialmente para la administración rutinaria de antibióticos o inyecciones extra de hierro.
4. Evitar el movimiento de los animales retrasados a otras habitaciones con animales más jóvenes. Para ello se deben eliminar los lechones que no tengan el peso y el estado de salud necesario al destete y de nuevo a las 10 semanas de vida y se debe utilizar el sistema de "todo dentro-todo fuera" en las lechoneras, dejando 2 ó 3 días para la limpieza y la desinfección de las salas entre los lotes.
5. Evitar los sistemas de retroalimentación utilizados para estimular la inmunidad consistentes en dar a las cerdas gestantes los restos de las placentas y los lechones nacidos muertos.

Con el uso de este sistema ha sido posible eliminar la enfermedad en algunas granjas, sin utilizar para ello medidas complementarias (McCaw y Henry, 1995).

En cuanto a los intentos de controlar la enfermedad a nivel internacional, la comisión de la Unión Europea en su directiva 91/109 de marzo de 1991 estableció medidas de control para el movimiento de cerdos, obligando a los estados miembros a notificar los municipios en los que había aparecido la enfermedad y prohibiendo la exportación desde estas zonas hasta que las granjas afectadas se hubieran declarado libres de la misma (lo cual sucedía en un periodo de 8 semanas desde la desaparición de los signos clínicos). Sin embargo, la amplia y rápida distribución del VSRRP hizo que se levantaran estas medidas en octubre de 1992. Por otra parte, algunos países han establecido medidas de control, prohibiendo las importaciones de cerdos de países afectados.

1.11.2. Profilaxis médica

La primera vacuna frente a la enfermedad comercializada en el mundo fue lanzada al mercado en 1993 en España por Cyanamid bajo el nombre de Cyblue®. Es una vacuna muerta, con adyuvante oleoso que contiene $10^{5.5}$ DI₅₀CT de una cepa española del VSRRP obtenida en cultivos de MAP, lo cual ha hecho difícil su introducción en otros países, debido al riesgo de contaminación con otros agentes infecciosos que supone el uso de MAP. La vacuna va dirigida a la

Introducción

protección frente a los problemas asociados a la reproducción en cerdas de reposición y cerdas en producción. En cuanto a la administración ésta debe realizarse por la vía intramuscular. En la primovacunación se deben aplicar dos dosis separadas por un intervalo de 21 días, evitando la vacunación desde 10 días antes hasta 10 días después de la cubrición y 10 días antes del parto. Posteriormente se recomienda la revacunación durante la lactación, lo cual estimula la producción de IgAs las cuales tienen un papel importante en la inmunización previa de los lechones al secretarse en la leche. En las cerdas de reposición, la vacunación se debe realizar sistemáticamente a los 6 meses de edad, seguida de una revacunación a los 21 días. Cuando se le realizaron contrapruebas a la vacuna, es decir, se inocularon experimentalmente con una cepa virulenta del virus cerdas previamente vacunadas, entre los días 67 y 84 de gestación, se obtuvo como resultado una protección del 70% en relación con la prevención de las alteraciones de la reproducción comparado con los testigos no vacunados. De esta forma, en las cerdas vacunadas, el porcentaje de lechones vivos una semana después del parto fue del 73%, comparado con el 11,9% en las no vacunadas. Además, el 90% de los animales vacunados contraprobados con la cepa virulenta mostraron signos de celo al destete, fueron cubiertas y quedaron gestantes, mientras que el 90% de las cerdas no vacunadas presentaron repeticiones cíclicas (Plana Durán *et al.*, 1995a). Por otra parte, aunque la producción de anticuerpos tras la vacunación es muy limitada, los animales que no presentaban anticuerpos en el momento de la contraprueba resultaron estar protegidos, indicando que se desarrolla una inmunidad de base celular que juega un papel muy importante en la protección frente a la infección por este virus. Los estudios de campo, después de la aplicación de más de 1 millón de dosis, han sugerido un beneficio significativo en el porcentaje de repeticiones, el número de lechones nacidos vivos por cerda y año, el porcentaje de abortos, el número de lechones destetados por cerda y año y el número de lechones nacidos muertos (Plana Duran, 1994).

Otra vacuna lanzada recientemente al mercado español es la comercializada por Laboratorios Syva bajo la denominación PYRSVAC-183®. Es una vacuna viva atenuada preparada con la cepa ALL.183 a una concentración $\geq 10^{5.0}$ DI₅₀CT que ha obtenido licencia para su utilización en cerdos de cebo, pero no en reproductores. Puede ser utilizada a partir de las 3 semanas de vida y está indicada para la prevención de la forma respiratoria de la enfermedad. Al ir destinada a lechones y animales de cebo lleva un diluyente acuoso y se administra una sola dosis por la vía intramuscular.

A nivel mundial la vacuna que hasta la actualidad ha tenido mayor difusión es la comercializada por Boehringer Ingelheim Animal Health Incorporation la cual obtuvo licencia por primera vez en 1994 en EE.UU. (Gorcyca *et al.*, 1995a). Fue la primera vacuna viva modificada lanzada al mercado en el mundo y está preparada con la cepa de referencia americana del VSRRP ATCC VR-2332. Se comercializa en EE.UU. por los Laboratorios Nobl bajo el nombre de

Introducción

RespPRRS® y en el resto de países donde está permitida por Boehringer Ingelheim Vetmedica bajo el nombre de Ingelvac PRRS MLV®. Está autorizada únicamente para animales en crecimiento, donde parece evitar la aparición de los signos clínicos de la enfermedad asociados a la forma respiratoria que afecta a los cerdos en crecimiento, aunque recientemente ha sido modificada su licencia en EE.UU. y se permite su aplicación bajo el nombre de RespPRRS/Repro™ en hembras en producción no gestantes para controlar los problemas asociados a la reproducción (Lager y Mengeling, 1997). La pauta de vacunación en los lechones consiste en la aplicación de una sola dosis por la vía intramuscular entre las 3 y las 18 semanas de vida. En los estudios sobre esta vacuna realizados hasta la actualidad se ha podido demostrar que su aplicación en lechones produce una viremia detectable y bastante larga ya que es posible detectar el virus vacunal en el suero de los animales vacunados al día siguiente de la vacunación, siendo todavía virémicos 25 días después aproximadamente un 30% de los animales. Sin embargo, sí produce una protección frente a la infección con cepas virulentas ya que sólo el 30% de los cerdos vacunados presentan viremia tras la inoculación con cepas virulentas, siendo menor la duración de la misma, cuando se produce, que en los cerdos testigos (Gorcyca *et al.*, 1995a). Además, diferentes estudios, tanto de campo como experimentales, han demostrado que la vacuna es efectiva para la prevención de los signos clínicos de la enfermedad, provocando una disminución en la leucopenia asociada a la misma y en las lesiones pulmonares que produce. También es capaz de limitar la difusión de las cepas virulentas del virus ya que aumenta el número de $DI_{50}CT$ necesarias para producir una infección y disminuye la magnitud y duración de la eliminación del virus. De esta forma, el 40% de los animales centinelas puestos en contacto con los animales vacunados y contraprobados con una cepa virulenta no seroconvierten en un periodo de 28 días (Gorcyca *et al.*, 1995a,b; Kang *et al.*, 1996a). Algunos autores han descrito una disminución en el número de días al matadero, al presentar los animales vacunados una ganancia media diaria de peso mejor desde las lechoneras hasta el final del periodo de cebo (Sanford y Nuhn, 1996). Sin embargo, estos resultados no han sido apoyados por otros estudios que demuestran un peor comportamiento de los animales vacunados, comparados con los testigos (Pretzer *et al.*, 1997).

En cuanto a la producción de anticuerpos tras la vacunación se ha determinado que los animales vacunados presentan anticuerpos detectables tanto por técnicas de IFI como de ELISA a partir de la segunda semana después de la vacunación, apareciendo los anticuerpos neutralizantes a las 4 semanas de la vacunación. La duración media de estos anticuerpos oscila entre 112 y 118 días (Gorcyca *et al.*, 1995a; Roof *et al.*, 1995; Kang *et al.*, 1996a). La estimulación de la inmunidad a que da lugar la vacunación hace que, si se inoculan los animales vacunados con una cepa virulenta, se produzca un aumento en el título de anticuerpos neutralizantes a partir del día 7 p.i. (Gorcyca *et al.*, 1995a). Además de la respuesta inmune de base humoral descrita, la vacunación da lugar al desarrollo de una respuesta inmune de base celular caracterizada por una proliferación de linfocitos

T y una respuesta de hipersensibilidad retardada que sigue el mismo patrón en animales vacunados que en animales infectados con cepas virulentas (Bautista *et al.*, 1996b).

Aunque la vacuna sólo ha adquirido licencia para su aplicación en reproductores recientemente y bajo determinadas circunstancias, se han llevado a cabo distintos estudios para determinar su comportamiento en animales adultos, demostrándose que el virus vacunal produce una viremia detectable, aunque de menor duración que en los animales no vacunados (Gorcyca *et al.*, 1997b; Lager y Mengeling, 1997), encontrándose en los lavados pulmonares durante largos periodos de tiempo y eliminándose por distintas vías. Además es capaz de atravesar la barrera placentaria, pudiendo dar lugar al nacimiento de lechones virémicos los cuales presentan una apariencia normal, sin que sea posible diferenciarlos de los animales no infectados (Lager y Mengeling, 1997). También hay que tener en cuenta que, debido a la eliminación del virus por los animales vacunados, es posible que los lechones nacidos de cerdas vacunadas adquieran el virus de sus madres después del nacimiento (Mengeling *et al.*, 1996a). Los estudios de seguridad llevados a cabo vacunando cerdas seronegativas en el último tercio de gestación, bien sea con la dosis terapéutica o con dosis 10 veces superiores a la misma, parecen indicar que la vacunación no da lugar a alteraciones en la reproducción (Gorcyca *et al.*, 1997a). En las pruebas de eficacia llevadas a cabo vacunando cerdas 28 días antes de la cubrición e inoculándolas con cepas virulentas, tanto homólogas como heterólogas, alrededor del día 90 de gestación, se ha demostrado que la vacunación da lugar a la aparición de anticuerpos neutralizantes, produciéndose una respuesta anamnésica tras la inoculación con cepas virulentas. Además, cuando la inoculación se realiza con la cepa homóloga se evita la aparición de los síntomas asociadas a la reproducción tales como abortos tardíos o partos prematuros, siendo las camadas de los animales vacunados en cuanto al número de lechones nacidos vivos, muertos y momificados y en cuanto al crecimiento de los lechones similar a las de los animales no vacunados y no inoculados con cepas virulentas y superior a las de los animales inoculados con cepas virulentas pero no vacunados. Por otra parte, la viabilidad de los lechones nacidos vivos es mejor en las cerdas que han sido vacunadas, sin que se pueda demostrar el nacimiento de lechones infectados en el útero (Gorcyca *et al.*, 1996b; 1997a). Cuando la inoculación se realiza con una cepa heteróloga también se observa que la vacuna evita la aparición de los problemas asociados a la reproducción, aunque un 15% de los lechones nacen infectados y un 8% presentan anticuerpos frente al virus (Gorcyca *et al.*, 1997a). Por el contrario, cuando la vacuna se administra a cerdas gestantes entre los días 50 y 55 de gestación, aunque no aparecen síntomas sistémicos y disminuye significativamente el porcentaje de lechones nacidos muertos y momificados, de los lechones nacidos vivos de animales vacunados un 33% son lechones débiles frente a un 96% en el grupo de cerdas no vacunadas, muriendo en los primeros 21 días de vida el 56% de los lechones procedentes de las madres vacunadas y un 96% de los procedentes de las no vacunadas. Los lechones nacidos vivos procedentes de cerdas vacunadas no

Introducción

sólo presentan una baja viabilidad sino que además en el primer día de vida un 92% y un 90% son positivos a la presencia de anticuerpos por las técnicas de IPMA y de SN respectivamente frente al 53% y el 0% respectivamente en los lechones de cerdas del grupo no vacunado (Gorcyca *et al.*, 1997b). También se ha demostrado que la duración de la inmunidad a la que da lugar la vacunación es suficiente para proteger a cerdas vacunadas en su primera gestación de la exposición a una cepa virulenta en la segunda gestación (Mengeling *et al.*, 1996a). Se cree que la vacuna confiere una inmunidad protectora frente a la cepa homóloga que comienza dentro de los primeros 80 días después de la vacunación y se extiende por un periodo de al menos 600 días (Lager y Mengeling, 1997). También se produce protección cruzada, siempre que la cepa sea antigénicamente similar, comenzando dentro de los 30 días que siguen a la vacunación y aumentando con el tiempo hasta al menos los 5 ó 6 meses post-vacunación. Si la cepa no es similar se desarrolla una ligera respuesta protectora pero depende de la cepa que se estudie (Lager y Mengeling, 1997).

Un aspecto importante de la vacunación de reproductores es la protección frente a la infección por cepas virulentas que puedan conferir a los lechones tras el nacimiento. Sin embargo, en este punto existe controversia. Mientras algunos autores afirman que los lechones nacidos de cerdas vacunadas presentan anticuerpos neutralizantes de origen maternal a las 4-5 semanas de vida, lo que los hace más resistentes a la enfermedad, como se demuestra por una menor incidencia de viremia, un menor nivel de leucopenia, una menor incidencia de fiebre y una mejor ganancia de peso comparándolos con lechones procedentes de cerdas sin vacunar cuando se inoculan con una cepa virulenta (Gorcyca *et al.*, 1996a), otros no observan diferencias con lechones procedentes de cerdas no vacunadas cuando se inoculan a las 2-3 semanas de vida con cepas virulentas (Mengeling *et al.*, 1996a).

En los verracos los efectos de la vacunación no están claros ya que, aunque se produce una disminución de la viremia tras la inoculación con una cepa virulenta y algunos autores no han podido detectar el virus en el semen de los animales vacunados (Nielsen *et al.*, 1995), otros han podido detectarlo durante periodos variables entre los días 6 y 39 post-vacunación (Shin *et al.*, 1995; Christopher-Hennings *et al.*, 1996b). En cuanto a la respuesta que se produce frente a la inoculación con una cepa virulenta, mientras en algunos estudios no se detecta el virus después de la misma (Molitor y Shin, 1995; Shin *et al.*, 1996), en otros es posible detectarlo durante periodos muy cortos de tiempo entre los días 4 y 24 después de la contraprueba (Nielsen *et al.*, 1995; Christopher-Hennings *et al.*, 1996b). Por otra parte, dado que el virus parece capaz de producir alteraciones en la calidad espermática de los verracos infectados, se han realizado estudios para ver si el virus vacunal tiene algún efecto sobre la misma, habiéndose obtenido resultados variables. Aunque en algunos estudios no se han observado diferencias en la calidad espermática después de la vacunación (Nielsen *et al.*, 1995), en otros se ha observado una disminución de la motilidad

progresiva y un aumento de las formas anormales (Christopher-Hennings *et al.*, 1996b).

En pruebas de protección cruzada, vacunando animales e inoculándolos posteriormente con aislados europeos, se ha demostrado que la vacuna ofrece una protección cruzada frente al virus Lelystad, estimulando una respuesta serológica tanto frente a cepas americanas como a cepas europeas y reduciendo los días de fiebre, así como el nivel y la duración de la viremia tras la infección con el virus europeo (Gorceyca *et al.*, 1995a; Kang *et al.*, 1996a).

A pesar de que esta vacuna no tiene licencia para su uso en los reproductores, se ha utilizado en estos animales en determinados casos. De esta forma, se utiliza en EE.UU. en cerdas de reposición cuando son seronegativas y se van a introducir bien en una granja que ha padecido la enfermedad en el pasado o bien en granjas donde se ha comprobado serológicamente, por la existencia de subpoblaciones, que la infección es activa en los reproductores, aún en ausencia de síntomas asociados a la reproducción (Dee, 1996b). Sin embargo, la seguridad de la vacuna puede no ser suficiente para la realización de esta práctica ya que, en ocasiones, después de la vacunación se han producido aumentos en el número de lechones nacidos débiles, nacidos muertos y momificados y también problemas de repeticiones, disminuyendo la tasa de partos un 10% (Loula, 1996). Para la aplicación de la vacuna en reproductores se han seguido distintos protocolos de vacunación. En las cerdas de reposición se han aplicado dos dosis separadas 30 días. En animales en producción se han seguido distintas pautas de vacunación. Una de ellas es la aplicación de la vacuna cada 3 meses, de forma que todos los animales son expuestos rápidamente al virus vacunal con la ventaja de que se eliminan rápidamente las subpoblaciones. El inconveniente es que el virus vacunal puede atravesar la barrera placentaria cuando se aplica en el último tercio de gestación, dando lugar al nacimiento de animales infectados que pueden transmitir la infección a sus compañeros de camada. Para evitar este problema se ha desarrollado otra pauta que ha sido denominada "6/60". Consiste en la aplicación de la vacuna el sexto día después del parto, el día 60 de gestación o en ambos momentos. La desventaja es que la inmunización es más lenta, de forma que se mantienen más tiempo las subpoblaciones, pudiendo dar lugar a la eliminación del virus de campo y por tanto a la infección de animales susceptibles. Sin embargo, es más segura ya que no se vacunan cerdas en el último tercio de gestación. La tercera forma de aplicación de la vacuna tiene en cuenta la cinética de desarrollo de la inmunidad de base celular. Consiste en vacunar a todos los animales que estén por debajo de los 70 días de gestación, incluyendo las cerdas en lactación, las destetadas y los verracos en el mismo día y a las cerdas de más de 70 días de gestación, en el día 7 post-parto. A los 30 días de la dosis inicial se aplica una segunda dosis, siguiendo el mismo protocolo. Una vez inmunizada toda la población, para mantener un nivel inmunitario alto se vacunan las cerdas en el día 7 del periodo de lactación. Este sistema tiene la ventaja de eliminar rápidamente las subpoblaciones, ya que todos los animales reciben dos dosis de vacuna en el plazo

Introducción

de 2-3 meses y además evita la vacunación en el último tercio de gestación (Dee, 1996b). En cuanto a los lechones, en ocasiones se ha administrado una primera dosis a los 2-3 días de edad por la vía intranasal y una segunda dosis a las 2-4 semanas de estar en las lechoneras por la vía intramuscular con buenos resultados, aunque con el inconveniente del trabajo adicional que supone la vacunación. Para evitar este inconveniente, y dados los buenos resultados obtenidos, se ha empezado a vacunar a los lechones por la vía intramuscular una sola vez antes de los 5 días de vida (Loula, 1996).

A finales del verano de 1996 ha obtenido licencia en EE.UU. una vacuna comercializada por los laboratorios Schering-Plough Animal Health bajo el nombre de Prime Pac PRRS®. Es una vacuna viva modificada realizada con una cepa americana del VSRRP aprobada para ser utilizada en cerdas de reposición y cerdas en producción para prevenir los problemas asociados a la reproducción que produce el SRRP. En las pruebas realizadas para la obtención de la licencia se ha visto que sólo el 1,8% de las cerdas vacunadas mostraron una disminución del apetito durante un periodo corto de tiempo tras la inoculación y ninguno de los 1467 lechones inoculados mostró ningún tipo de reacción adversa. En cuanto a la protección que confiere la vacuna, se ha visto que es eficaz tanto cuando se contraprueba con una cepa virulenta homóloga como cuando se utiliza una cepa heteróloga en la contraprueba. Cuando la cepa utilizada en la contraprueba era la homóloga los datos obtenidos fueron: 90% de lechones nacidos vivos en las cerdas vacunadas frente al 74% en el grupo de las testigos; 1% de lechones de bajo peso en el grupo de cerdas vacunadas frente al 17% en el grupo de las cerdas no vacunadas; 89% de lechones viables en el grupo de las cerdas vacunadas frente al 62% en las no vacunadas; 17% de mortalidad en los lechones en las primeras 7 semanas de vida frente al 38% de mortalidad en los lechones nacidos de cerdas testigos y 0% de lechones virémicos en las primeras 7 semanas de vida en lechones nacidos de cerdas vacunadas frente al 100% en el grupo de las cerdas testigos. Cuando la contraprueba se realizaba con una cepa heteróloga los resultados obtenidos fueron: 75% de lechones nacidos vivos en las cerdas vacunadas frente al 47% en el grupo de las testigos; 1% de lechones de bajo peso nacidos de cerdas vacunadas frente al 10% en el grupo de las testigos; 92% de lechones viables al nacimiento en las cerdas vacunadas frente al 36% en las testigos; 5% de mortalidad de los lechones en las 2 primeras semanas de vida en el grupo de las cerdas vacunadas frente al 90% en los lechones del grupo de las cerdas no vacunadas y 5% de lechones virémicos al nacimiento cuando las madres había sido vacunadas, frente al 69% de los lechones en el grupo de las cerdas no vacunadas. La vacuna se debe administrar por la vía intramuscular en una sola dosis de 3 a 6 semanas antes de la cubrición tanto en cerdas de reposición como en cerdas en producción.

Esta vacuna no está autorizada para su uso en lechones ni en verracos. A pesar de ello se han llevado a cabo estudios para valorar su eficacia en la prevención de los problemas respiratorios

Introducción

asociados con frecuencia al PRRS en los lechones y de la presentación de la enfermedad en los verracos. En cuanto a su efecto en el primer caso, vacunando lechones de 3 semanas de vida e inoculándolos con una cepa virulenta, homóloga o heteróloga, a las 7 semanas de vida se ha observado que, aunque la vacunación da lugar a la aparición de un periodo de viremia detectable, la duración del mismo es menor en el grupo de animales vacunados que en los testigos con una duración media inferior a 2 semanas. Esta viremia da lugar a la eliminación del virus en los animales vacunados, como ha quedado demostrado por la infección de un 20% de animales no vacunados que estaban en contacto con el grupo de los vacunados. En cuanto al desarrollo de anticuerpos, se ha demostrado que la vacuna da lugar a la producción de anticuerpos neutralizantes a las 2 semanas de la vacunación. La inoculación con una cepa homóloga 4 semanas post-vacunación demostró que la vacunación previa daba lugar a una reducción en la duración de la viremia y evitaba la transmisión horizontal del virus. Por su parte el título de anticuerpos neutralizantes sufrió un aumento muy significativo en la primera semana tras la inoculación. En cuanto a la sintomatología y las lesiones asociadas a la infección por el VSRRP, la primera se vio notablemente reducida y las segundas experimentaron una reducción estadísticamente significativa, comparado con el grupo de animales que no habían sido vacunados previamente. Cuando la inoculación experimental se realizó con una cepa heteróloga se produjo una respuesta febril entre los 4 y los 9 días p.i. en los animales previamente vacunados, mientras que la duración de la misma fue desde el día 1 hasta el día 14 en los animales no vacunados. También la viremia fue más corta en los animales vacunados. La vacunación dio lugar a la estimulación de una respuesta inmune frente a la cepa heteróloga, detectándose anticuerpos neutralizantes 1 semana antes que en los animales que no habían sido vacunados y a la disminución en la gravedad y extensión de las lesiones. En resumen, la eficacia de la protección frente a una cepa heteróloga resultó ser menor que frente a una cepa homóloga, aunque sí se observaron diferencias estadísticamente significativas comparado con el grupo de animales no vacunados (Hesse *et al.*, 1997).

En cuanto al estudio llevado a cabo con verracos los resultados obtenidos demuestran que la vacunación, con dosis 200 superiores a las utilizadas en las cerdas, no da lugar a la aparición de ningún síntoma, mientras que es posible detectar viremia en un número reducido de animales (un 25% de los verracos utilizados). Sin embargo, el virus vacunal se eliminó en el semen del 50% de los verracos vacunados, aunque no más allá del día 17 post-vacunación. A pesar de la presencia del virus en el semen, la calidad espermática no sufrió ningún cambio tras la vacunación. La inoculación con una cepa virulenta no dio lugar a la presentación de una viremia detectable ni a la eliminación del virus en el semen de ninguno de los verracos vacunados. La inoculación con una cepa virulenta no dio lugar a alteraciones significativas en la calidad espermática, aunque sí se produjo una disminución en el porcentaje de espermatozoides con movimientos progresivos en los animales no vacunados que no fue posible demostrar en los vacunados. En los primeros esta

Introducción

disminución fue de un 32% mientras que en los segundos fue de sólo el 5%. En cuanto a la detección de anticuerpos, utilizando una técnica de ELISA, sólo 3 de los 4 verracos utilizados habían desarrollado anticuerpos en el día 35 post-vacunación. Sin embargo, todos ellos presentaron anticuerpos neutralizantes. La inoculación experimental no dio lugar a cambios significativos en los títulos de anticuerpos presentes en los animales vacunados, mientras que los no vacunados seroconvirtieron dos semanas después de la inoculación (Hutchinson *et al.*, 1997).

Diversos grupos están investigando en el desarrollo de posibles vacunas, tanto recombinantes (Sanz *et al.*, 1995), como utilizando cepas atenuadas. En cuanto a las primeras, en la actualidad se están realizando pruebas con varias posibles vacunas cuyo antígeno se obtiene en células infectadas con baculovirus que expresan las proteínas codificadas por la ORF 3, la ORF 5, la ORF 7 o todas ellas. En los estudios realizados vacunando cerdas con las proteínas codificadas por cada una de las ORFs anteriormente mencionadas y contraprobándolas con una cepa virulenta se ha demostrado que los mejores resultados, medidos por el porcentaje de supervivencia de los lechones se consiguen cuando se incluyen las proteínas codificadas por las tres ORFs (Plana Durán *et al.*, 1995b). En cuanto a las vacunas preparadas con cepas atenuadas, se están realizando estudios para determinar el grado de atenuación de distintas cepas. En España, se están realizando pruebas con una vacuna preparada con una cepa española atenuada por pases sucesivos en cultivos de MAP (Laboratorios Hipra). En EE.UU. también se están realizando estudios similares. Así, un trabajo realizado con tres cepas americanas atenuadas por pases seriados en líneas celulares (NADC-8, NADC-9 Y NVSL-14) y la cepa de la vacuna RespPRRS® ha demostrado que la más segura de las cuatro es la cepa de la vacuna RespPRRS®, aunque todas han demostrado una patogenicidad mucho más baja que la de los aislados originales. Ninguna de ellas afectó a la gestación o a la ganancia media diaria de peso posterior de los lechones cuando se inocularon cerdas en el día 90 de gestación, pero el 25,3% de los lechones nacieron infectados y el 88,4% se habían infectado el día 21 de vida, indicando que es necesaria una mayor atenuación. Sin embargo, cuando se inoculan estas mismas cerdas en su segunda gestación con una mezcla de cepas virulentas, solamente 1 de 71 lechones nació infectado, indicando el desarrollo de una inmunidad protectora a largo plazo (Mengeling *et al.*, 1996a,b).

En cualquier caso, no se debe emprender un programa de vacunación sin realizar previamente un diagnóstico adecuado, sin conocer cómo es la circulación del virus en la granja y sin tener en cuenta qué otros factores están influyendo en la presentación de la enfermedad y que, por tanto, necesitan ser corregidos.

II. OBJETIVOS

Objetivos

Tras la identificación de la enfermedad en 1987 y especialmente después del aislamiento del agente causal a finales de 1990 se diseñaron una serie de estudios encaminados a conocer la patogenia de la infección por el VSRRP en las hembras al final de la gestación, debido, sin duda, a que la sintomatología asociada a los brotes de la enfermedad se caracterizaba por un fallo reproductivo en el que la aparición de abortos tardíos y partos prematuros eran los signos más frecuentes (Meldrum, 1991; Loula, 1991; de Jong *et al.*, 1991a; Hopper *et al.*, 1992). Así, un número importante de los estudios de patogenia que se han llevado a cabo se han centrado en el efecto del VSRRP en el último tercio de gestación (Terpstra *et al.*, 1991; Plana *et al.*, 1992; Christianson *et al.*, 1992; Bøtner *et al.*, 1994; Lager *et al.*, 1994; Mengeling *et al.*, 1996d; Park *et al.*, 1996c). Sin embargo, no se ha prestado demasiada atención al efecto que la infección con el VSRRP podría producir en las hembras en las primeras etapas de la gestación. En cuanto a los efectos que la infección por el VSRRP puede causar en los verracos, en un principio no se estudiaron, limitándose los datos disponibles a observaciones llevadas a cabo en centros de inseminación artificial. Posteriormente se han llevado a cabo una serie de trabajos cuyos resultados son, en ocasiones, contradictorios, sin que de forma concluyente se haya establecido cuáles son las consecuencias que la infección por este virus tiene en los mismos. Dada la importancia que ambas cuestiones pueden tener tanto sobre los rendimientos productivos como sobre la epidemiología de la enfermedad, nuestra atención se centró en dos áreas claramente diferenciadas:

A. La infección por el VSRRP en el verraco.

B. La infección por el VSRRP en las hembras al comienzo de la gestación.

De la consideración de cada una de ellas derivan una serie de objetivos destinados al mejor conocimiento de ambas cuestiones.

A. EFECTO DE LA INFECCIÓN POR EL VSRRP SOBRE EL VERRACO

En este área de trabajo nos propusimos una serie de objetivos encaminados a esclarecer los efectos más relevantes que la infección por el VSRRP tiene en los verracos. Los objetivos propuestos son los siguientes:

A.1. Estudio de la sintomatología.

Algunos estudios de campo apuntan a que los verracos infectados con el VSRRP pueden

Objetivos

desarrollar los signos clínicos de carácter sistémico que se asocian normalmente a la enfermedad. Sin embargo, en ocasiones, se han descrito infecciones subclínicas, ya que sólo un 25% de los verracos de centros de inseminación artificial infectados presentan signos clínicos (Feitsma *et al.*, 1992). Cuando aparecen se manifiestan como anorexia, fiebre, signos respiratorios y pérdida de la libido (Feitsma *et al.*, 1992; Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1994a,b; Christopher-Hennings *et al.*, 1995a). En vista de la escasa información disponible cuando empezó nuestro estudio, el primer objetivo que nos propusimos fue caracterizar la sintomatología que desarrollan los verracos adultos tras la infección con el VSRRP.

A.2. Estudio de la infección sobre la calidad espermática.

Este estudio se planteó debido a la discrepancia existente entre las observaciones llevadas a cabo en distintos centros de inseminación artificial, que encuentran una disminución en la calidad espermática del semen de verracos que han sido infectados por el VSRRP (de Jong *et al.*, 1991; Feitsma *et al.*, 1992), y los resultados obtenidos en algunas infecciones experimentales, que únicamente encuentran cambios poco significativos (Swenson *et al.*, 1994a; Yaeger *et al.*, 1993; Shin *et al.*, 1995). La limitada información disponible y las discrepancias existentes en los resultados observados en los trabajos llevados a cabo en este aspecto, justifican el estudio detenido del mismo.

A.3. Estudio sobre la posible eliminación del VSRRP por el semen.

Este aspecto se ha tenido en cuenta debido a que, en ocasiones, se ha atribuido la entrada del virus en algunas granjas al uso de semen contaminado con el virus (Robertson, 1992; Yaeger *et al.*, 1993). Sin embargo, existen marcadas diferencias en los resultados obtenidos en los trabajos de eliminación del virus por la vía genital existentes hasta la actualidad ya que, mientras algunos autores afirman que la eliminación se produce de forma constante durante largos periodos de tiempo (Swenson *et al.*, 1994a; Christopher-Hennings *et al.*, 1995a,b,c), otros sólo han podido determinar su presencia de forma intermitente durante periodos de tiempo muy limitados (Swenson *et al.*, 1994b; Teuffert *et al.*, 1995). Como consecuencia, para obtener un mejor conocimiento de este aspecto nos propusimos estudiar el patrón de eliminación del VSRRP en el semen de los verracos infectados.

Objetivos

A.4. Estudio de la distribución orgánica del virus tras la infección y su eliminación.

En la actualidad, existe un gran desconocimiento en este punto debido a que los trabajos de distribución y eliminación realizados se han llevado a cabo utilizando fundamentalmente lechones como animal de experimentación (Rossow *et al.*, 1994a, 1995; 1996a; Halbur *et al.*, 1996), cuyo comportamiento, en este aspecto, puede ser distinto al de los animales adultos. Como consecuencia, y debido a la importancia que la eliminación del virus puede tener en la transmisión de la enfermedad, especialmente si se introducen animales que estén eliminando el virus en una granja seronegativa, se planteó un estudio para determinar la distribución orgánica y la eliminación del virus después de la infección experimental de machos adultos.

A.5. Determinación de la procedencia del virus que se elimina por la vía genital.

Como un aspecto particular de la distribución orgánica del virus y una vez conocida la posibilidad de eliminación del VSRRP en el semen de los verracos infectados, nos propusimos conocer cuál es el origen del virus que se elimina por la vía genital, estudiando si su presencia se debe a la multiplicación del virus en algún órgano del aparato genital o, por el contrario, procede de la contaminación de las secreciones prepuciales.

A.6. Estudio sobre la posibilidad de la transmisión venerea del VSRRP tanto en cerdas seronegativas al virus como en cerdas preinmunizadas.

Este estudio se planteó como consecuencia de la polémica que la eliminación del VSRRP por el semen ha levantado acerca de su transmisión por esta vía. De hecho, la entrada de la enfermedad en determinadas granjas se ha atribuido al uso de semen procedente de animales infectados (Robertson, 1992; Yaeger *et al.*, 1993). Sin embargo, los trabajos llevados a cabo para determinar la posible transmisión del virus por el uso de semen infectado han dado resultados contradictorios (Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1994b, 1995a; Teuffert *et al.*, 1995; Gradil *et al.*, 1996). Las discrepancias existentes entre los distintos trabajos llevados a cabo justifican el estudio detallado de este aspecto, especialmente teniendo en cuenta la importancia epidemiológica que pudiera tener. La utilización de animales tanto seronegativos como preinmunizados para llevar a cabo este estudio se debe a dos razones. Por un lado al desconocimiento del efecto que la existencia de una inmunidad desarrollada previamente pueda tener sobre la transmisión de la enfermedad por esta vía y por otro al auge que tiene en la actualidad el empleo de vacunas de uno u

Objetivos

otro tipo para prevenir la sintomatología que normalmente se asocia a la infección. Como consecuencia decidimos emplear la única vacuna frente a la enfermedad que en ese momento tenía licencia en nuestro país.

A.7. Estudio del efecto que la presencia del VSRRP en el semen puede tener sobre la eficacia reproductiva.

Existen algunos trabajos que han descrito una reducción en la tasa de concepción tras la inseminación con semen contaminado con el virus (Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1994b; Lager *et al.*, 1996). Sin embargo, en ningún caso ha quedado claro el efecto que el uso de semen contaminado tiene sobre las tasas de concepción y fertilización y sobre el desarrollo embrionario, ya que las diferencias encontradas nunca han sido estadísticamente significativas. Sin embargo, en las epizootias de la enfermedad se han descrito con frecuencia un aumento en las repeticiones y una disminución en el tamaño de las camadas. Ante la ausencia de resultados concluyentes en lo que se refiere a la incidencia de la enfermedad sobre la eficacia reproductiva, se diseñó un estudio encaminado a conocer el efecto que la presencia del VSRRP en el semen puede tener sobre la reproducción tanto en animales seronegativos como en animales previamente preinmunizados.

B. ESTUDIO DE LA INFECCIÓN POR EL VSRRP SOBRE CERDAS AL COMIENZO DE LA GESTACIÓN

Para conocer el efecto que la infección por el VSRRP tiene sobre las hembras en el primer tercio de gestación se tuvieron en cuenta varios aspectos que se concretaron en los siguientes objetivos:

B.1. Estudio de la sintomatología

Al igual que sucedía en el caso de los verracos, la infección por el VSRRP en las cerdas puede dar lugar a una ausencia de síntomas, pasando por tanto desapercibida (Swenson *et al.*, 1994b; Lager y Mengeling, 1995; Gradil *et al.*, 1996; Lager *et al.*, 1996b) o por el contrario puede dar lugar a la aparición de signos de depresión y anorexia (Christianson *et al.*, 1991; Plana *et al.*, 1992; Bøtner *et al.*, 1994; Park *et al.*, 1996c) y a la presentación de temperaturas febriles (Terpstra *et al.*, 1991; Christianson *et al.*, 1991, 1992, 1993). Como consecuencia de las discrepancias obtenidas en las distintas observaciones llevadas a cabo, el primer objetivo propuesto en esta segunda área de trabajo fue el estudio de la sintomatología en las cerdas.

Objetivos

B.2. Estudio del efecto de la infección por el VSRRP en el momento de la cubrición sobre las tasas de concepción y fertilización.

Decidimos estudiar este aspecto ya que no se conoce si la infección de la cerda en este momento puede interferir con el proceso de fertilización. La información disponible procede de estudios llevados a cabo inseminando cerdas con semen contaminado con el VSRRP, sin que existan resultados concluyentes ya que, aunque en ocasiones se ha observado un mayor porcentaje de repeticiones (Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1994b; Lager *et al.*, 1996), no siempre ha sido así (Lager *et al.*, 1995). La falta de información definitiva sobre el efecto que el VSRRP tiene sobre las tasas de concepción y fertilización justifica un estudio detallado de este punto debido a la importancia que de ello se deriva.

B.3. Estudio del efecto de la infección por el VSRRP al comienzo de la gestación sobre el desarrollo embrionario.

Este aspecto se tuvo en cuenta debido a que en algunas epizootias de la enfermedad se han descrito repeticiones acíclicas, indicando que quizá sea posible que se produzca o bien la expulsión o bien la reabsorción de los embriones tras la infección de la madre por el virus en las primeras semanas de la gestación, dando lugar por tanto a una salida a celo más tarde de la fecha prevista. Por otra parte se desconoce si el VSRRP puede tener un efecto directo sobre los embriones al comienzo de la gestación o si su presencia puede dar lugar a alteraciones en las condiciones del útero en este momento, interfiriendo con el proceso de implantación embrionaria. Ambas cosas provocarían la muerte de los embriones bien de forma directa o indirecta interfiriendo con el medio ambiente de los mismos. Como consecuencia de todo lo anteriormente expuesto, y para dilucidar si alguna de las hipótesis anteriormente expuestas es cierta, se planteó un estudio encaminado a conocer el efecto que sobre el desarrollo embrionario tiene la infección de la cerda por el VSRRP en el momento de la fertilización, tras la eclosión de los embriones de la zona pellucida pero antes de la implantación, en el momento de la implantación y después de la misma.

B.4. Estudio de la susceptibilidad de los embriones a la infección por el VSRRP.

Este estudio se llevó a cabo debido a que los pocos trabajos realizados para determinar el efecto que tiene el virus sobre los embriones al comienzo de la gestación (Mengeling *et al.*, 1994; Lager y Mengeling, 1995; Lager *et al.*, 1994, 1996a) no determinan de forma concluyente si la

Objetivos

infección por el VSRRP es posible en este momento o no. Los resultados parecen indicar que, aunque los embriones y fetos son susceptibles a la infección por el VSRRP desde el principio de la gestación, la probabilidad de infección transplacental aumenta al avanzar la misma. Por otra parte, la información respecto a la susceptibilidad de los embriones al VSRRP antes de la implantación es muy limitada (Swenson *et al.*, 1995a). Como consecuencia de todo lo anteriormente expuesto, se planteó este estudio para conocer la susceptibilidad de los embriones al VSRRP cuando la cerda se infecta en el momento de la fertilización, tras la eclosión de los embriones de la *zona pellucida* pero antes de la implantación, en el momento de la implantación y después de la misma.

B.5. Estudio in vitro del efecto que el VSRRP tiene sobre los embriones en el estadio de entre 4 y 16 células, determinando el papel protector que pueda tener la zona pellucida, la susceptibilidad de los embriones a la infección por el virus en los primeros estadios del desarrollo y el efecto que la presencia del virus pueda tener en el desarrollo embrionario.

La *zona pellucida* ha demostrado jugar un papel protector frente a la infección con otros virus (Bolin *et al.*, 1983; Dulac y Singh, 1988; Singh *et al.*, 1984; Singh y Thomas, 1987a,b). Sin embargo no existe ningún trabajo que estudie este aspecto en la infección con el VSRRP. Como consecuencia, hemos querido determinar si la *zona pellucida* tiene un papel relevante en la protección de los embriones frente a este virus. Además, este estudio permite establecer si la falta de susceptibilidad de los embriones antes de la implantación a la infección por el VSRRP se debe a una falta de susceptibilidad real o a la incapacidad del virus para alcanzar los embriones que se encuentran libres en la luz uterina.

III. MATERIALES Y MÉTODOS

3.1.Cultivos celulares y virus utilizados

Todos los experimentos se llevaron a cabo utilizando el pase 7° en MAP de la cepa 5710 del VSRRP, aislada en el norte de España en 1992 y cedida por el Dr. Enrique Espuña (Laboratorios Hipra). Los lotes de virus utilizados para realizar todos los estudios se obtuvieron inoculando cultivos de MAP. Para su obtención se utilizaban los pulmones de lechones de 4 semanas de vida obtenidos asépticamente inmediatamente después del sacrificio llevado a cabo seccionando la vena yugular y realizando una sangría a muerte, tras la administración intramuscular de 0,1 g de azaperona (Stresnil®, Laboratoiros Esteve). Una vez extraídos los pulmones, se ocluía la entrada de la traquea con la ayuda de unas pinzas de Crile y se trasladaban a una cabina de flujo laminar donde se realizaban 3 lavados de los mismos con una solución salina tamponada estéril (PBS) con una concentración 137 mM de NaCl (Merck); 2,68 mM de KCl (Merck); 1,47 mM de KH_2PO_4 (Merck) y 16,3 mM de Na_2HPO_4 (Merck) con un pH de 7,2 suplementada con una mezcla antibiótica que contenía, a la concentración final, 200 UI/mL de penicilina G sódica, 200 $\mu\text{g/mL}$ de sulfato de estreptomicina y 0,5 $\mu\text{g/mL}$ de anfotericina B (Gibco-BRL). Los lavados se realizaban utilizando una bomba peristáltica que permitía la introducción del PBS (aproximadamente 300 mL en cada lavado) por la traquea. El líquido de lavado era extraído posteriormente por la misma vía, con la ayuda de dicha bomba, a la vez que se realizaban suaves masajes en la superficie del pulmón para ayudar al desprendimiento de los MAP. El líquido recuperado de los pulmones, el cual contenía los MAP, era centrifugado a 600 g durante 10 minutos y el sedimento suspendido en un medio de cultivo celular esencial mínimo, preparado con sales de eagle y modificado por Dulbecco (DMEM) (Gibco-BRL), suplementado con la misma mezcla antibiótica descrita anteriormente. Posteriormente se volvía a centrifugar en las condiciones arriba indicadas y el sedimento obtenido se suspendía en 50 mL de DMEM, suplementado con antibióticos. Una vez hecho esto, se contaba la cantidad de células obtenidas para ajustarla a la concentración celular deseada, utilizando como diluyente DMEM suplementado con antibióticos y un 10% de suero fetal bovino (SFB) (Gibco-BRL). Las concentraciones celulares empleadas en los distintos soportes utilizados para el cultivo eran las siguientes:

1. Frascos de cultivo celular de 75 cm^2 de superficie: 9×10^7 células/frasco, en un volumen total de 30 mL de DMEM suplementado con antibióticos y un 10% de SFB.
2. Placas de cultivo celular de 96 pocillos: 27×10^3 células/pocillo, en un volumen total de 200 μL /pocillo de DMEM suplementado con antibióticos y un 10% de SFB.
3. Placas de cultivo celular de 24 pocillos: $2,2 \times 10^6$ células/pocillo, en un volumen total de 1 mL de DMEM suplementado con antibióticos y un 10% de SFB.

3.1.1 Producción de los lotes de virus utilizados

Para producir los lotes de virus utilizados en este trabajo se sembraban los MAP en frascos de cultivo celular de 75 cm² de superficie (Nunc). Al cabo de entre 5 y 18 horas de incubación a 37°C en una atmósfera que contenía un 5% de CO₂ en aire, el medio de cultivo era descartado y se añadían 2 mL de un inóculo que contenía 5 x 10⁵ DI₅₀CT/mL del VSRRP. Después de 1,5 horas de adsorción a 37°C en una atmósfera con un 5% de CO₂ en aire, se añadían 30 mL de DMEM suplementado con antibióticos y un 10% de SFB. Al cabo de 3-4 días, cuando aproximadamente el 80-90% de las células mostraban el ECP característico del virus, los frascos de cultivo eran congelados a -80°C y sometidos a 3 ciclos de congelación y descongelación. Posteriormente su contenido era centrifugado a 600 g durante 15 minutos para separar los detritus celulares. El sobrenadante obtenido se titulaba y se guardaba a -80°C hasta su utilización.

3.1.2. Titulación del virus

Para titular tanto los lotes de virus empleados en los distintos estudios como las muestras clínicas que habían resultado positivas al realizar el aislamiento del virus se empleaba el medio de cultivo DMEM como diluyente y se realizaban diluciones seriadas de la muestra en base 10. Estas diluciones se inoculaban en placas de 96 pocillos sembradas previamente con MAP, siguiendo la técnica anteriormente descrita. Los cultivos se mantenían a 37°C en una atmósfera que contenía un 5% de CO₂ en aire, realizando diariamente la lectura de las placas hasta el día 5 p.i. para observar el ECP característico del virus. El título vírico se calculaba utilizando el método descrito por Reed y Muench (1938), expresándose en la forma de DI₅₀CT/mL.

3.1.3. Aislamiento del virus en las muestras clínicas

Para realizar el aislamiento vírico en las muestras obtenidas en los distintos experimentos llevados a cabo se utilizaron cultivos de MAP preparados de la forma descrita en el apartado 3.1 de este capítulo. En algunos casos se utilizaron placas de cultivo celular de 24 pocillos (Nunc) y en otros casos placas de cultivo celular de 96 pocillos (Nunc). En el primer caso, una vez sembrados los MAP y después de entre 5 y 18 horas de incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire, se descartaba el medio de cultivo y se añadían las muestras por duplicado, poniendo 200 µL de cada muestra por pocillo. Al cabo de 1,5 horas de adsorción a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire, se retiraba el inóculo y se añadía 1 mL de DMEM suplementado con antibióticos y un 10% de SFB a cada pocillo. A los 4 y 5 días de incubación a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire, las placas se examinaban para observar el ECP característico del virus. En el quinto día de

incubación, después de examinar las placas, éstas eran congeladas y descongeladas 3 veces, los restos celulares eliminados mediante una centrifugación a 4°C a 600 g durante 15 minutos y el sobrenadante inoculado de la forma anteriormente descrita en otras placas de cultivo celular sembradas con MAP. Estas placas se observaban durante otros 5 días para confirmar la presencia del virus en las muestras.

Cuando se utilizaban placas de cultivo celular de 96 pocillos, para realizar el aislamiento vírico la inoculación de las muestras y el tratamiento posterior de los cultivos se realizaba de la misma manera que cuando se utilizaban las placas de cultivo celular de 24 pocillos con la única excepción de que cada una de las muestras se inoculaba en 4 pocillos de una placa, utilizando como inóculo 100 μ L de la muestra en cada pocillo. Pasadas 1,5 horas que se daban como período de adsorción las muestras se retiraban y se añadían a cada pocillo 200 μ L de DMEM suplementado con antibióticos y un 10% de SFB.

Como testigo negativo se utilizaban dos pocillos en cada placa de cultivo celular de 24 y 4 pocillos en cada placa de cultivo celular de 96. Estos pocillos eran inoculados con DMEM suplementado con antibióticos y un 10% de SFB. Como testigo positivo se utilizaban muestras procedentes de los animales testigos a las que se habían añadido 10^4 , 10^3 y 10^2 DI₅₀CT/mL del VSRRP.

Para determinar la sensibilidad de los lotes de MAP se inoculaban los cultivos con 10^5 , 10^4 , 10^3 , 10^2 , 10^1 y 1 DI₅₀CT/pocillo del VSRRP preparadas haciendo diluciones seriadas de un lote de virus con un título conocido.

3.2. Detección del VSRRP mediante el empleo de la técnica de RT-PCR

La técnica de RT-PCR se llevó a cabo siguiendo el método descrito por Suárez *et al.* (1994) con una modificación en la técnica de extracción del ARN.

Para su realización el primer paso era la extracción del ARN del virus, para lo cual se mezclaban 500 μ L de la muestra con el mismo volumen de fenol (Merck) equilibrado con TE (fenol blanco). Se agitaba durante 1 minuto y se centrifugaba en una minifuga a 16000 revoluciones por minuto (rpm) durante 5 minutos a temperatura ambiente. Se recogía el sobrenadante con cuidado y se le añadían 250 μ L de fenol equilibrado con TE y 250 μ L de cloroformo-isoamílico (Merck). Este paso se repetía 2 ó 3 veces hasta que el sobrenadante quedaba limpio. A este sobrenadante ya limpio se le añadía 1 mL de cloroformo-isoamílico, se agitaba durante 1 minuto y se dejaba reposar

para separar las fases, recogiendo el sobrenadante una vez separadas. El ARN obtenido se precipitaba añadiendo al sobrenadante que habíamos recogido 50 μ L de TNE (10x) y 1 mL de etanol frío (Merck). Se agitaba bien la mezcla durante 1 minuto y se dejaba 1 hora a -80°C . Pasado este tiempo se centrifugaba en una minifuga a 4°C y 16000 rpm durante 20 minutos. El sedimento obtenido se lavaba con 200 μ L de etanol frío al 75% y se centrifugaba en la minifuga durante 2 ó 3 minutos. Posteriormente se retiraba el sobrenadante y se secaba el sedimento durante 5 minutos con un secador. Este sedimento se suspendía en 25 μ L de agua tratada con dietilpircarbonato (DEPC) (Sigma Chemical Co.).

El fenol blanco se preparaba mezclando volúmenes iguales de fenol y del tampón TE, agitando bien y centrifugando posteriormente durante 5 minutos a 600 g para separar las fases. Una vez hecho esto, se retiraba la fase acuosa y se repetía el proceso dos veces. El tampón TE utilizado es una solución 10 mM de Tris (Merck) y 1 mM de EDTA (Merck). El tampón TNE (10x) se preparaba con Tris 1 M con un pH=7,5; EDTA 0,5 M y NaCl (Merck) 5M.

Una vez extraído el ARN, el siguiente paso era producir el ADN complementario para lo cual se ponían en un vial tipo eppendorf los 25 μ L de agua tratada con DEPC que contenían el ARN, 2 μ L de una mezcla que contenía igual proporción de cada uno de los 4 deoxinucleótidos (d-citosina; d-guanidina; d-timidina y d-adenosina) (Boehringer Mannheim) a una concentración 10 mM para cada uno de ellos, 8 μ L del tampón que acompaña a la enzima transcriptasa inversa (Promega) (cuya composición a la concentración final en la reacción es la siguiente: 50 mM de Tris-HCl pH=8,3; 50 mM de KCl; 10 mM de MgCl_2 ; 0,5 mM de espermidina y 10 mM de DTT) y 3,5 μ L del cebador inverso a una concentración de 1,42 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$. Esta mezcla se dejaba 5 minutos a 65°C y luego 10 minutos a temperatura ambiente. Posteriormente se añadían 1 μ L de la enzima transcriptasa inversa obtenida de viriones purificados del virus de la amieloblastosis aviar a la concentración de 5000 U/mL (AMV Reverse Transcriptase, Promega) y 0,25 μ L de un inhibidor de ARNasas a la concentración de 40000 U/mL (rRNAsin®, Promega). Esta mezcla se incubaba 1 hora a 42°C .

Por último se amplificaba el ADN complementario producido mediante la reacción de PCR. Para ello, a cada vial de reacción se le añadían a 3 μ L del producto resultante de la reacción anterior, 5 μ L del tampón que acompaña a la enzima polimerasa termoestable (cuya composición a la concentración final en la reacción es 10 mM Tris-HCl pH=8,8; 1,5 mM de MgCl_2 ; 50 mM de KCl y 0,1% de Triton X-100), 1,5 μ L de una mezcla de los 4 deoxinucleótidos (Boehringer Mannheim) a una concentración 10 mM para cada uno de ellos, 1 μ L del cebador inverso (a la concentración de 150 ng/ μ L), 1 μ L del cebador directo (a la concentración de 150 ng/ μ L), 0,25 μ L de la enzima

ADN polimerasa termoestable (Dynazyme®, Finnzymes OY) a la concentración de 2 U/ μ L y 38 μ L de agua tratada con DEPC. Para evitar la evaporación durante los ciclos de amplificación a cada uno de los viales de reacción se le añadía una gota de aceite mineral (Sigma Chemical Co.). Todas las reacciones de PCR se llevaban a cabo en un termociclador (Thermal Cycler - Techne, modelo PHC-3, Techne Inc.) programado de la siguiente manera:

1. 1 ciclo de 1 segmento: temperatura de 94°C durante 2 minutos.
2. 35 ciclos, cada uno de ellos con los 3 segmentos siguientes:
 - Segmento 1: desnaturalización a 94°C durante 1 minuto.
 - Segmento 2: anillamiento a 60°C durante 1 minuto.
 - Segmento 3: extensión a 72°C durante 1 minuto.
3. 1 ciclo de 1 segmento: extensión final a la temperatura a 72°C durante 10 minutos.

Los oligonucleótidos empleados para la técnica de RT-PCR fueron sintetizados en un sintetizador automático (Pharmacia LKB. Gene Assembler Plus - Pharmacia) con el programa "Gene Assembler Plus", versión 1.4, en el Laboratorio de Secuenciación del Departamento de Microbiología de la Facultad de Farmacia de la Universidad Complutense de Madrid y la concentración de los mismos se determinó por espectrofotometría con un espectrofotómetro (PYE Unicam, Phillips).

Los productos de la reacción de PCR se visualizaban mediante electroforesis en geles de agarosa y posterior visualización bajo luz ultravioleta. Los geles de agarosa se preparaban con agarosa [Nu Sieve 3:1 (FMC Bioproducts)] al 1,5% en el tampón TBE [Tris base (Merck) 89,2 mM, ácido bórico (Merck) 89 mM, 4 mL/L de EDTA (Merck) 0,5 M y con un pH=8] y eran teñidos con bromuro de etidio a la concentración de 0,5 μ g/mL. Las muestras se cargaban en el gel, tras su inclusión en un tampón de carga que contenía un 30% de glicerol en agua, un 0,25% de azul de bromofenol y un 0,25% de xileno-cianol. Como marcador de peso molecular se utilizaba el 1 Kb DNA Ladder (Gibco/BRL) a la concentración de 100 ng/ μ L. La electroforesis se realizaba en una solución de TBE empleando un alimentador de electroforesis (PS 2500 DC Power Supply, Hoefer Sci. Inst.) a una intensidad de corriente eléctrica de 80 voltios durante aproximadamente 45 minutos. Las bandas de ADN se visualizaban bajo luz ultravioleta (302 nm de longitud de onda) en un transiluminador LKB-2011 Macrovue.

3.3. Detección de anticuerpos frente al VSRRP mediante la técnica de IPMA

Para la realización de la técnica de IPMA se utilizaban cultivos de MAP en placas de cultivo celular de 96 pocillos preparadas según se ha descrito en el apartado 1 de este capítulo e infectados

Materiales y Métodos

con 10^2 DI₅₀CT/pocillo del VSRRP. Al cabo de 2 ó 3 días de cultivo, cuando ya se empezaba a ver el ECP, pero antes de que se hubiera despegado el tapiz, se lavaba la placa 3 veces con una mezcla de PBS [preparado con una concentración 137 mM de NaCl (Merck); 2,68 mM de KCl (Merck); 1,47 mM de KH₂PO₄ (Merck) y 16,3 mM de Na₂HPO₄ (Merck) con un pH de 7,2] y agua destilada en la proporción 1:2. Posteriormente se dejaba secar la placa durante aproximadamente 1 hora (hasta que estuviera totalmente seca) a 37°C y se congelaba a -20°C durante 45 minutos para romper las células y permitir la exposición de los antígenos que se encuentran normalmente en el interior de las mismas.

A continuación se fijaban las células durante 5 minutos con paraformaldehído (Merck) al 4% (peso/volumen) en PBS, preparado de la forma anteriormente descrita, a 4°C y se lavaban en una mezcla de PBS y agua destilada en la proporción 1:2 un total de 3 veces.

Luego se añadían 100 µL/pocillo de una dilución 1:50 de un suero positivo o bien diluciones 1:2 en una solución 0,15 M de NaCl (Merck) con un 0,05% de Tween 20 (Merck) de los sueros que se estaban estudiando y se dejaban incubar durante 1 hora a 37°C en una cámara húmeda.

Pasado este tiempo se lavaba 2 veces la placa con una solución de lavado compuesta por PBS preparado de la forma anteriormente descrita y suplementado con un 0,05% de Tween 20 y se incubaba durante 1 hora a 37°C con Proteína A-peroxidasa preparada con 2,5 µg de Proteína A-peroxidasa (Sigma Chemical Co.) en 10 mL de la solución de lavado.

Posteriormente se volvía a lavar la placa 2 veces con la solución de lavado y se añadían 50 µL/pocillo del sustrato recién preparado. El sustrato se preparaba añadiendo 5 mg de 3-amino-9-etil-carbazol (ETC) (Sigma Chemical Co.) a 0,75 mL de dimetilformamida (DMF) (Merck), mezclándolo, después de disolverlo bien, con 12,5 mL del tampón sustrato [una solución 0,05 M de acetato sódico (Merck) con un pH=5 ajustado con ácido acético] y añadiendo 6,25 µL de peróxido de hidrógeno al 30%.

Se incubaba a continuación la placa durante 15-30 minutos a temperatura ambiente y en la oscuridad hasta que empezaba a aparecer el color. Pasado este tiempo se lavaba dos veces la placa con la solución de lavado y se leían los pocillos en un microscopio invertido (Leitz). Los pocillos donde se había incubado un suero positivo, si la técnica estaba bien realizada, contenían unos MAP que presentan una coloración rojo burdeos con forma de anillo en el citoplasma.

3.4. Detección de anticuerpos frente al VSRRP mediante la técnica de ELISA

Para la detección de anticuerpos por la técnica de ELISA se empleaba una técnica de competición comercializada por Ingenasa (IngezimPRRS®) que utiliza como antígeno una proteína vírica recombinante (producto de la ORF 7) expresada en un sistema de baculovirus y como conjugado anticuerpos monoclonales desarrollados frente a la nucleocápside del virus. Esta misma técnica se utilizó tanto para la determinación de los sueros positivos y negativos como para la titulación de los sueros positivos.

3.5. Diseño experimental para llevar a cabo los objetivos A.1, A.2 y A.3

Para llevar a cabo los objetivos A.1; A.2 y A.3, es decir, para estudiar la sintomatología asociada a la infección por el VSRRP en los verracos, el posible efecto de la infección con este virus sobre la calidad espermática y la eliminación del VSRRP a través del semen se diseñó el siguiente experimento:

3.5.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos

Para este experimento se utilizaron 12 verracos cruce de Landrace x Large White seronegativos al VSRRP utilizando una técnica de IPMA. Durante aproximadamente 4 meses antes del inicio de la prueba los animales se mantuvieron en grupos de 5 y 2 animales respectivamente en establos aislados con cama de paja. Los animales fueron alimentados con 2 kg/día de un pienso que contenía un 16,5% de proteína y un 72,5% de nutrientes digestibles (Nutriganse). Al comienzo de la prueba, cuando los animales tenían aproximadamente 10 meses de vida, sólo 11 animales pudieron ser utilizados, ya que uno de ellos no se adaptó a la técnica de recogida de semen.

Diariamente se observó la ingesta de alimento de todos los verracos y la posible presencia de signos clínicos. Además se tomaron las temperaturas rectales de todos ellos desde el día 29 antes de la inoculación hasta el día 48 después de la misma.

3.5.2. Inoculación experimental y toma de muestras

Cinco de los verracos utilizados (numerados del 2 al 6) constituyeron el grupo A y fueron inoculados intranasalmente con 6×10^6 DI₅₀CT del VSRRP suspendidas en 5 mL de DMEM. Otros cuatro verracos (numerados del 7 al 10) constituyeron el grupo B y fueron inoculados

Materiales y Métodos

intranasalmente con 6×10^4 DI₅₀CT del VSRRP suspendidas en 5 mL de DMEM. Los dos verracos restantes (números 11 y 12) fueron empleados como testigos y fueron inoculados intranasalmente con el sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar tratado de la misma manera que los que contenían el virus. Las inoculaciones se realizaron después de la recogida de semen del día 0 con la ayuda de una cánula de polietileno adaptada a una jeringa de cono Luer (Terumo), introduciendo 2,5 mL del inóculo en cada una de las fosas nasales durante la inspiración.

A todos los verracos se le tomaron dos muestras de sangre antes de la inoculación, una durante los primeros días del periodo de aclimatación y la otra 3 días antes de comenzar la prueba. Así mismo, después de la inoculación se tomaron muestras de sangre en los días 3, 9, 15, 25 y 72. Las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular empleando el sistema de extracción de sangre Vacutainer® (Becton Dickinson) utilizando tubos no siliconados de 10 mL y agujas de 21G x 1 1/2".

Además de las muestras de sangre, se tomaron muestras de heces y de las secreciones nasales y prepuciales en cada uno de los días de recogida de semen mediante el empleo de hisopos estériles. Los hisopos eran sumergidos en 2 mL de DMEM suplementado con antibióticos inmediatamente después de su obtención y almacenados a -80°C hasta su procesamiento para realizar la detección vírica.

En cada uno de los días de recogida de semen se hacían alícuotas de 4 mL de semen completo (mezcla de la fracción rica y la fracción pobre) que eran almacenadas a -80°C hasta su utilización para la detección vírica.

3.5.3. Recogida de semen y valoración de la calidad espermática

Las recogidas de semen se realizaban manualmente una vez a la semana, recogiendo por separado la fracción rica y la fracción pobre del eyaculado en dos termos previamente calentados a 37°C y cubiertos con una gasa estéril para evitar la caída de la tapioca sobre el eyaculado. Los días de recogida fueron los días -49, -42, -35, -28, -21, -14, -7, 0, +3, +7, +14, +21, +28, +35, +42, +49, +56, +63 y +72, siendo el día 0 el día de la inoculación experimental de los verracos.

Después de la recogida, se medía el volumen tanto de la fracción rica como de la fracción pobre del semen mediante la utilización de probetas.

La motilidad se medía calculando el porcentaje de espermatozoides móviles, teniendo en

Materiales y Métodos

cuenta si la motilidad era progresiva o no, observando a 200 aumentos en un microscopio de fondo claro (Nikon) una gota de semen que había sido colocada sobre un portaobjetos (Menzel-Glaser) calentado a 37°C y tapada con un cubreobjetos (Menzel-Glaser) también precalentado a 37°C.

La concentración se determinaba, tanto en la fracción rica como en la fracción pobre, realizando una dilución 1:100 del semen en suero fisiológico formolado preparado añadiendo 3 mL/L de formol (formalina al 35-40%, Merck) en una solución 154 mM de NaCl (Merck) y realizando un recuento en una cámara de Bürker.

Las formas anormales se valoraban realizando un recuento de 200 espermatozoides en un microscopio de contraste de fases (Zeiss) a 1000 aumentos. Para realizar el recuento se tuvieron en cuenta las alteraciones en la morfología de la cabeza, de la pieza intermedia y de la cola, así como la presencia de gotas citoplasmáticas proximales y de gotas citoplasmáticas distales. El recuento se llevaba a cabo utilizando espermatozoides fijados previamente con una solución fijadora preparada con glutaraldehído al 2%. Para preparar esta solución se le añadían 8 mL de glutaraldehído comercial al 25% (Merck) a 92 mL de una solución en agua destilada de glucosa 146,3 mM (Merck), citrato trisódico dihidratado (Merck) 34 mM y bicarbonato sódico (Merck) 23,8 mM. Para fijar los espermatozoides se añadían 100 µL de la fracción rica del semen a un tubo que contenía 2 mL de esta solución fijadora.

El estado de los acrosomas se valoraba utilizando la técnica de Pursel y Johnson (1974), fijando los espermatozoides en la solución de glutaraldehído descrita y utilizando un microscopio de contraste de fases a 1000 aumentos para la valoración. Los acrosomas se clasificaron en normales y alterados, incluyendo en este último grupo tanto a los acrosomas dañados como a los ausentes.

La prueba de la resistencia osmótica (ORT) se llevaba a cabo siguiendo la técnica descrita por Schilling *et al.* (1984), valorando el estado de los acrosomas tras un periodo de 15 minutos de incubación a 37°C en una solución isotónica y de un periodo de incubación de 2 horas a 37°C en una solución hipotónica. La solución isotónica utilizada fue el diluyente de semen MRA® (Kubus SA) preparado según las instrucciones del fabricante (39 g del diluyente en polvo disuelto en un litro de agua destilada) y calentado previamente a 37°C. La solución hipotónica se preparó mezclando en cantidades iguales el diluyente MRA® y agua destilada, calentándola también previamente a 37°C. A 3 mL de las soluciones isotónica e hipotónica se le añadían 200 µL de semen y se incubaban a 37°C durante un periodo de 15 minutos en el caso de la solución isotónica y de 2 horas en el caso de la solución hipotónica. Pasado este tiempo se recogían 200 µL de cada una de las soluciones y se fijaban en 2 mL de la solución fijadora utilizada para valorar las formas

anormales y los acrosomas.

3.5.4. Determinación del VSRRP en las muestras obtenidas

3.5.4.1. Preparación de las muestras

Las muestras de semen utilizadas para la detección vírica fueron congeladas y descongeladas tres veces para romper los espermatozoides y posteriormente divididas en 4 alícuotas. De ellas, una parte fue utilizada para realizar la prueba biológica, otra para la realización de la técnica de RT-PCR y el resto se dividió a su vez en otras dos partes que fueron sometidas a dos tratamientos distintos para intentar eliminar la toxicidad del semen para los cultivos celulares y posteriormente utilizadas para inocular cultivos de MAP. El primero de estos tratamientos se realizó siguiendo el método de Kahrs *et al.* (1977) y consistió en mezclar el semen (0,5 mL) en la proporción 1:1 con DMEM que contenía un 1% de un inhibidor de la tripsina procedente de la soja (Sigma Chemical Co.), incubando la mezcla a temperatura ambiente durante 1 hora. Posteriormente se realizaron tres ciclos de congelación y descongelación y se centrifugaron las muestras a 1500 g durante 15 minutos a 5°C. Los sobrenadantes se utilizaron para inocular cultivos de MAP para el aislamiento del virus. El segundo procedimiento se realizó siguiendo el método de Medveczky y Szabo (1981) para lo cual se centrifugó el semen a 1500 g durante 45 minutos a 5°C. Posteriormente se volvió a centrifugar el sobrenadante a 2500 g durante 45 minutos a 5°C y 1 mL de este segundo sobrenadante se mezcló con 9 mL de DMEM suplementado con antibióticos y un 15% de SFB para realizar una dilución 1:10. Esta mezcla se incubó a 28°C durante 30 minutos y con ella se inocularon cultivos de MAP para intentar el aislamiento vírico.

Las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente hasta que coagularon. Posteriormente se centrifugaron a 600 g durante 10 minutos a 4°C y se recogieron las muestras de suero en condiciones de esterilidad. Estas muestras se almacenaron en tubos de 5 mL a -80°C hasta su utilización tanto para determinar la presencia de anticuerpos como para determinar la presencia del virus, para lo cual se descongelaron a 37°C, se diluyeron en la proporción 1:4 en DMEM suplementado con antibióticos y se filtraron por filtros de jeringa de 0,45 µm de tamaño de poro (Acrodisc®, Gelman). Estas muestras fueron inoculadas en cultivos de MAP para intentar el aislamiento vírico y utilizadas para realizar la prueba de RT-PCR.

Los hisopos nasales, prepuciales y fecales que se había congelado a -80°C sumergidos en 2 mL de DMEM fueron descongelados, agitados con la ayuda de un agitador y los 2 mL de medio recogidos con la ayuda de una aguja de 20 G x 1 1/2" (Terumo) y una jeringa de 5 mL (Terumo) y

filtrados por un filtro de jeringa de 0,45 μm de tamaño de poro. Estas muestras fueron inoculadas en cultivos de MAP para intentar el aislamiento vírico y utilizadas para realizar la prueba de RT-PCR.

3.5.4.2. Métodos de detección de anticuerpos utilizados

Para la detección de anticuerpos en las muestras de suero obtenidas de los animales, así como para la titulación de las muestras positivas, se utilizó la técnica de IPMA descrita en el apartado 3.3 de este capítulo.

3.5.4.3. Métodos de detección vírica empleados

Para la detección vírica se utilizaron cultivos de MAP para intentar el aislamiento vírico, la prueba de RT-PCR y una prueba biológica, inoculando lechones seronegativos al VSRRP con muestras de semen.

Para intentar el aislamiento vírico todas las muestras fueron inoculadas por duplicado en placas de cultivo celular de 24 pocillos sembradas previamente con MAP según el procedimiento descrito en el apartado 3.1.3 de este capítulo.

La prueba de la RT-PCR se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita en el apartado 3.2 de este capítulo.

La inoculación experimental de los lechones se llevó a cabo utilizando animales de 5 semanas de vida seronegativos al VSRRP mediante la técnica de IPMA. Los lechones fueron identificados e inoculados por la vía intranasal con cada una de las muestras de semen obtenidas de todos los verracos en los días +3, +7 y +14, utilizando para la inoculación 0,5 mL de semen mezclado con 0,5 mL de DMEM. Las inoculaciones se llevaron a cabo introduciendo en cada fosa nasal 0,5 mL del inóculo durante la inspiración con la ayuda de una cánula de polietileno adaptada a una jeringa de cono Luer. A los 10 días de la primera inoculación, todos los lechones fueron inoculados nuevamente, esta vez por la vía subcutánea con una emulsión compuesta por 0,5 mL de semen y 0,5 mL de adyuvante incompleto de Freund.

Como testigo positivo se utilizó un lechón que fue inoculado con una muestra de semen de uno de los verracos del grupo de los testigos al que se le habían añadido 10^3 DI₅₀CT/mL y los lechones inoculados con el semen procedente de los verracos del grupo de los testigos fueron

utilizados como testigos negativos.

A todos los lechones se les extrajo sangre en el día 28 después de la segunda inoculación mediante punción de la vena yugular utilizando el sistema Vacutainer®. De estas muestras de sangre se obtuvo el suero, siguiendo el método descrito anteriormente, el cual fue utilizado para determinar la presencia de anticuerpos frente al VSRRP mediante la técnica de IPMA descrita en el apartado 3.3 de este capítulo.

3.5.5. Análisis estadísticos

Los valores obtenidos para los distintos parámetros de calidad espermática entre los días -49 y +49 fueron sometidos a un análisis de varianza utilizando tres pruebas estadísticas diferentes: la prueba de Ficher, la prueba de Wells y la prueba de Brown-Forsythe para valorar la homogeneidad de los grupos de verracos para los distintos parámetros estudiados. Para realizar la comparación de los resultados obtenidos antes y después de la inoculación con el VSRRP se utilizaron las pruebas estadísticas anteriormente mencionadas, además de la prueba pareada de Turkey y la prueba de rangos múltiples de Duncan, y también la prueba pareada de Dunnet, aplicada utilizando la media de los valores obtenidos en los distintos días antes de la inoculación experimental como testigo y comparándolo con los valores obtenidos tras la inoculación. Las pruebas estadísticas se realizaron aplicando el paquete estadístico de Dixon (1992).

3.6. Diseño experimental para llevar a cabo los objetivos A.1, A.4 y A.5

Para completar el objetivo A.1, consistente en el estudio de la sintomatología de la enfermedad en los verracos, y llevar a cabo los objetivos A.4 y A.5, es decir, estudiar la eliminación del virus por las distintas vías, así como la duración de la misma, la distribución del VSRRP por los distintos órganos después de la infección, teniendo en cuenta los lugares preferentes de aislamiento, y la procedencia del virus que se elimina con el semen se diseñó el siguiente experimento:

3.6.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos

Para este experimento se utilizaron 20 verracos cruce de Landrace x Large White seronegativos al VSRRP mediante una técnica de ELISA. Desde su llegada a las instalaciones de la facultad y durante la duración de la prueba los verracos se mantuvieron en grupos de 5 en establos aislados con cama de paja. Los animales fueron alimentados con 2 kg/día de un pienso que

contenía un 16,5% de proteína y un 72,5% de nutrientes digestibles (Nutriganse). Al comienzo de la prueba los animales tenían aproximadamente 6 meses de vida.

Diariamente se observó la ingesta de alimento y la posible presencia de signos clínicos en cada uno de los verracos. Además se tomaron las temperaturas rectales de todos ellos desde el día de la inoculación hasta el momento del sacrificio de cada uno.

3.6.2. Inoculación experimental de los animales con el VSRRP y sacrificio de los mismos

Todos los animales fueron identificados con una numeración correlativa del 1 al 20 e inoculados en el día 0, día del comienzo del experimento, con 5×10^6 DI₅₀CT del VSRRP por la vía intranasal, para lo cual se introdujeron 2,5 mL de la suspensión vírica utilizada como inóculo en cada uno de los orificios nasales durante la inspiración con la ayuda de una cánula de polietileno adaptada a una jeringa de cono Luer.

Los animales fueron sacrificados secuencialmente, a partir del día 2 p.i. y hasta el día 37 con la siguiente cadencia de sacrificios: verracos números 1 y 2 en el día 2 p.i.; verraco número 3 en el día 3 p.i.; verracos números 4 y 5 en el día 4 p.i.; verraco número 6 en el día 5 p.i.; verracos números 7 y 8 en el día 6 p.i.; verraco número 9 en el día 7 p.i.; verracos números 10 y 11 en el día 8 p.i.; verraco número 12 en el día 9 p.i.; verracos números 13 y 14 en el día 10 p.i.; verracos 15 y 16 en el día 13 p.i.; verraco número 17 en el día 17 p.i.; verraco número 18 en el día 23 p.i.; verraco número 19 en el día 30 p.i. y verraco número 20 en el día 37 p.i..

Para el sacrificio de los animales se les administraron por la vía intravenosa, en la vena de la oreja, con la ayuda de una palomilla de 0,65 x 20 mm (Venofix®, Braun), 1 g de ketamina base y 50 mg de clorbutol (Imalgène®, Rhône Mérieux), sangrándolos posteriormente a muerte.

3.6.3. Toma de muestras

A todos los animales se les extrajo sangre dos veces antes de la inoculación experimental, la primera en el momento de su adquisición y la segunda en el día 0, antes de realizar la inoculación con el VSRRP. Después de la misma se tomaron muestras de sangre en el momento del sacrificio y, a todos los animales que permanecían en ese momento en el estudio, en los días 4, 6, 9, 13, 17, 23 y 30 p.i.. Las muestras de sangre se obtuvieron mediante punción de la vena yugular, utilizando el sistema de extracción de sangre Vacutainer®.

Materiales y Métodos

En el momento del sacrificio se tomaron muestras de orina y heces y de las secreciones nasales, orofaríngeas y prepuciales. Las muestras de orina se tomaron por cistocentesis utilizando para ello agujas de 20 G x 1 1/2" y jeringas de 5 mL. Para la obtención del resto de las muestras se utilizaron hisopos estériles que fueron introducidos por ambas fosas nasales, en la oro-faringe, en el prepucio y en el recto. Inmediatamente después de su obtención los hisopos fueron introducidos en tubos previamente rotulados que contenían 2 mL de DMEM suplementado con antibióticos y congelados a -80°C hasta su procesamiento para la determinación de la presencia del virus. Las muestras de orina fueron introducidas en tubos de 5 mL previamente rotulados y congeladas a -80°C hasta su procesamiento para la determinación de la presencia del virus.

En la necropsia se tomaron muestras de los siguientes órganos: ganglios submandibulares derecho e izquierdo, amígdalas, ganglios paratraqueales, ganglios mediastínicos, timo, pulmón, hígado, bazo, ganglios mesentéricos, placas de Peyer y ganglios inguinales superficiales derecho e izquierdo. Todas las muestras fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización para intentar la detección del virus.

Además se recogió todo el aparato reproductor, del cual se tomaron muestras de ambos testículos, de las glándulas bulbouretrales derecha e izquierda, de las vesículas seminales derecha e izquierda, de la próstata y de ambos epidídimos, los cuales fueron diseccionados y extraídos enteros, para posteriormente seccionarlos teniendo en cuenta su división anatómica en cabeza, cuerpo y cola. También se recogieron los ganglios testiculares siempre que fueron visibles. Todas las muestras se guardaron individualmente en bolsas rotuladas a -80°C hasta su procesamiento para determinar la presencia del virus en las mismas.

Antes de la sección de los epidídimos en cabeza, cuerpo y cola se extrajo semen de la cola del epidídimo, para lo cual se canularon los canalículos de la cola del epidídimo con una aguja de 25 G x 5/8" (Terumo) y se introdujeron con una jeringa 2 mL de diluyente de semen MRA® preparado según las instrucciones del fabricante. La mezcla de diluyente y semen que salía por el conducto deferente era recogida en placas de cultivo celular de 4 pocillos (Nunc). Se tomaron muestras de semen de ambos epidídimos las cuales fueron tratadas por separado.

De las glándulas anejas, se tomaron muestras del líquido seminal mediante punción de las vesículas seminales tanto derecha como izquierda con la ayuda de una aguja de 18 G x 1 1/2" (Terumo) y una jeringa de 5 mL. Las muestras de líquido seminal fueron introducidas en tubos estériles de 5 mL que fueron rotulados y almacenados a -80°C hasta su procesamiento para la determinación de la presencia del virus.

3.6.4. Determinación del VSRRP en las muestras obtenidas

3.6.4.1. Preparación de las muestras

Las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente hasta que coagularon y posteriormente fueron centrifugadas a 4°C a 600 g durante 10 minutos para separar el suero, el cual fue obtenido en condiciones de esterilidad y guardado en tubos estériles a -80°C hasta su utilización tanto para intentar el aislamiento vírico como para determinar la presencia de anticuerpos.

Las muestras de orina se centrifugaron a 4°C a 1000 g durante 10 minutos y los sobrenadantes fueron filtrados por filtros de jeringa de 0,45 μm de tamaño de poro y almacenados en tubos estériles de 5 mL a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico.

Los distintos hisopos obtenidos fueron agitados con la ayuda de un agitador en los 2 mL de DMEM en que habían sido sumergidos y el DMEM recogido con la ayuda de una aguja y una jeringa y filtrado utilizando filtros de jeringa de 0,45 μm de tamaño de poro. Las muestras ya filtradas fueron almacenadas en tubos estériles a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico.

Los líquidos seminales fueron diluidos en la proporción 1:20 en DMEM suplementado con antibióticos y posteriormente filtrados por filtros de jeringa de 0,45 μm de tamaño de poro y almacenados a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico.

Las muestras de semen se centrifugaron durante 10 minutos a 1000 g. Los sobrenadantes fueron recogidos, filtrados por filtros de jeringa de 0,45 μm de tamaño de poro y almacenados a -80°C hasta que se utilizaron para intentar el aislamiento vírico. El sedimento, donde estaban los espermatozoides, se suspendió en 2 mL de PBS estéril, preparado de la misma forma que para la obtención de los MAP, y se volvió a centrifugar a 1000 g durante 10 minutos. Los sobrenadantes fueron descartados y los sedimentos se trataron de la misma forma que la primera vez. Después de volver a suspender los espermatozoides en PBS estéril después de la tercera centrifugación, se congelaron y descongelaron 3 veces para romperlos, se centrifugaron a 1000 g durante 10 minutos, se recogieron los sobrenadantes, que se filtraron por filtros de jeringa de 0,45 μm de tamaño de poro y se congelaron a -80°C hasta que fueron utilizados para intentar el aislamiento vírico.

Los órganos recogidos en la necropsia se maceraron con DMEM suplementado con antibióticos en la proporción 1:9 (peso:volumen) con la ayuda de un homogenizador tipo Potter.

Materiales y Métodos

Los macerados se centrifugaron a 1000 g durante 20 minutos para retirar los restos celulares y los sobrenadantes se filtraron por filtros de jeringa de 0,45 μm de tamaño de poro y fueron almacenados a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico.

3.6.4.2. Métodos empleados para la determinación de anticuerpos

Los anticuerpos específicos desarrollados frente al VSRRP fueron detectados mediante la técnica de ELISA descrita en el apartado 3.4. Los sueros positivos fueron titulados empleando la misma técnica.

3.6.4.3. Métodos de determinación vírica empleados

Para la determinación del virus en las muestras obtenidas se utilizó la técnica de aislamiento vírico en cultivos de MAP y, en las muestras de semen, una prueba biológica consistente en la inoculación experimental de lechones.

3.6.4.3.1. Aislamiento vírico

El aislamiento vírico se llevó a cabo inoculando todas las muestras por cuadruplicado en placas de cultivo celular de 96 pocillos previamente sembradas con MAP siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.1.3. de este capítulo.

3.6.4.3.2. Prueba biológica

Para la prueba biológica se utilizaron lechones de 4 semanas de edad seronegativos al VSRRP utilizando una técnica de ELISA. Los animales fueron identificados e inoculados intraperitonealmente con una mezcla de las muestras de semen de ambos epidídimos de un mismo animal, empleando tanto los sobrenadantes de la primera centrifugación del semen como los restos de los espermatozoides obtenidos tras las sucesivas centrifugaciones y ciclos de congelación y descongelación. El volumen total inoculado fue de aproximadamente 4 mL.

Como testigo positivo se inoculó un lechón con una muestra de semen procedente de un cerdo seronegativo al VSRRP tratada de la misma forma que las muestras obtenidas de los animales en estudio al que se le habían añadido 10^5 DI₅₀CT y como testigo negativo un lechón inoculado con una muestra de semen procedente de un cerdo seronegativo al VSRRP.

3.7. Diseño experimental para llevar a cabo los objetivos A.6 y A.7

Para llevar a cabo los objetivos A.6 y A.7, es decir, para estudiar la transmisión venerea de la enfermedad, tanto en animales seronegativos como preinmunizados y para estudiar el efecto que la presencia del virus en el semen pueda tener en las tasas de concepción y fertilización, así como en el desarrollo embrionario se diseñó el siguiente experimento:

3.7.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron 21 cerdas cruce de Landrace x Large White seronegativas al VSRRP utilizando una técnica de ELISA. Durante un periodo de aproximadamente 2 meses antes del comienzo de la prueba, los animales fueron mantenidos en condiciones de aislamiento en grupos de 7 en establos con cama de paja. Dos verracos seronegativos al VSRRP, utilizando una técnica de ELISA cruce de Landrace x Large White de aproximadamente 11 meses de edad al inicio de la prueba fueron mantenidos en condiciones de aislamiento en el mismo edificio y fueron utilizados para la detección de los celos en las cerdas del estudio.

Todos los animales fueron alimentados durante la duración de la prueba con 2 kg/día de un pienso que contenía un 16,5% de proteína y un 72,5% de nutrientes digestibles (Nutriganse).

Diariamente se observó a los animales, anotando la ingesta de alimento y la posible presencia de signos clínicos. Además se tomaron las temperaturas rectales de todos ellos desde el día 0 hasta el momento del sacrificio de los animales.

3.7.2. Sincronización de celos e inseminación artificial

A partir de los 170 días de vida todas las cerdas fueron expuestas diariamente durante 10 minutos por la mañana y otros 10 minutos por la tarde a la presencia de uno de los verracos utilizados, tanto para detectar la salida a celo de las cerdas como para estimular la llegada de la pubertad. Cuando todas las cerdas habían presentado signos externos de celo al menos una vez se llevó a cabo la sincronización de los mismos.

Los celos se sincronizaron mediante la administración por la vía oral de 20 mg/cerda/día de altrenogest (Regumate®, Hoechst-Roussel Veterinaria) durante 18 días siguiendo las instrucciones del prospecto. A las 24 horas de terminar el tratamiento con el progestágeno se administraron por la vía intramuscular 800 UI de PMSG (Serigan®, Laboratorios Ovejero) y a las 72 horas 400 UI de hCG (Coriogon®, Laboratorios Ovejero). Desde el momento en que se terminó el tratamiento de

sincronización las cerdas fueron expuestas por la mañana y por la tarde a la presencia del macho para llevar a cabo la detección de celos. Todas las cerdas que mostraron signos externos de celo entre las 24 y las 48 horas de la aplicación de la hCG fueron inseminadas 3 veces en total con un intervalo de 12 horas entre cada inseminación, empezando en el momento en que se detectó el celo.

Para llevar a cabo las inseminaciones artificiales se utilizaron dosis de semen procedentes de verracos seronegativos al VSRRP del centro de inseminación artificial de Proinserga SA (Segovia). Las dosis de semen fueron almacenadas en una estufa a 15°C hasta el momento de su utilización, momento en el cual se calentaron en un baño maría a 35°C durante 10 minutos. A continuación se introdujeron lentamente en el útero con la ayuda de catéteres de inseminación artificial previamente fijados en el cuello del útero.

El segundo día de celo se denominó día 0.

3.7.3. Tratamientos empleados e inoculación experimental

Las cerdas fueron divididas en 3 grupos de 7 animales cada uno:

- Grupo A, constituido por 7 cerdas (numeradas del 1 al 7) seronegativas al VSRRP que fueron inseminadas con semen al que se le habían añadido experimentalmente VSRRP. Para ello se le añadieron tanto a la primera como a la tercera dosis seminal 20 mL de un lote de virus con un título de 10^5 DI₅₀CT/mL inmediatamente antes de la inseminación. La segunda inseminación se realizó con semen exclusivamente. En total cada cerda fue inoculada con 4×10^6 DI₅₀CT del VSRRP por la vía intrauterina.
- Grupo B, formado por 7 cerdas (numeradas del 8 al 14) que habían sido vacunadas previamente. Las cerdas de este grupo recibieron una dosis de la vacuna muerta Cyblue® (Cyanamid) por la vía intramuscular 7 semanas antes de la exposición de los animales al virus y una segunda dosis 4 semanas antes de dicho momento. Las cerdas de este grupo fueron inseminadas con semen al que se le había añadido experimentalmente el VSRRP. El protocolo de inseminación seguido fue el mismo que se utilizó con las cerdas del grupo A. Cada cerda recibió por tanto un total de 4×10^6 DI₅₀CT del VSRRP por la vía intrauterina.
- Grupo C, constituido por 7 cerdas (numeradas del 15 al 21) que fueron utilizadas como testigos y que fueron inseminadas de la misma forma que las cerdas de los grupos A y B pero con semen que no contenía el VSRRP, sino 20 mL del sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar tanto en la

primera como en la tercera dosis seminal.

Todas las cerdas fueron sacrificadas en el día 20 ± 1 de gestación mediante aturdimiento con una corriente eléctrica continua y posterior sangrado a muerte.

3.7.4. Toma de muestras

Durante el periodo del estudio se tomaron 6 muestras de sangre. Las dos primeras se recogieron antes de la inoculación experimental, una de ellas al principio del periodo de aclimatación de los animales y la otra 3 días antes del día de salida a celo esperado. Después de la inoculación de los animales se tomaron muestras de sangre en los días 3, 6, 15 y 20. Las muestras de sangre se tomaron siguiendo el método anteriormente descrito.

Los días de extracción de sangre se tomaron también muestras de las secreciones nasales con la ayuda de hisopos estériles que fueron introducidos en profundidad en las fosas nasales. Los hisopos fueron introducidos inmediatamente después de su obtención en tubos que contenían 2 mL de DMEM suplementado con antibióticos y almacenados a -80°C hasta su utilización para los estudios de detección del virus.

En la necropsia se recogieron muestras del pulmón, las amígdalas, los ganglios linfáticos submandibulares, los ganglios linfáticos inguinales superficiales y los ganglios linfáticos uterinos. Todas las muestras fueron guardadas individualmente en bolsas rotuladas a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico. Además se recogió todo el aparato reproductor.

En los ovarios se contaron los cuerpos luteos y posteriormente se separaron y se guardaron individualmente a -80°C hasta su procesamiento para intentar el aislamiento vírico. Una vez hecho esto, se extendieron los cuernos uterinos, cortando el mesometrio con la ayuda de unas tijeras de Mayo, y se abrieron longitudinalmente por el borde antimesometrial. Los embriones presentes se contaron, se numeraron por su posición en el útero y posteriormente fueron extraídos y observados para ver si presentaban alguna lesión macroscópica. Una vez hecho esto, los embriones se guardaron individualmente en bolsas rotuladas a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico.

Además se tomaron muestras del líquido amniótico y de la pared uterina. Las muestras de líquido amniótico se obtuvieron mediante punción del saco amniótico con una aguja de 20 G x 1 1/2" (Terumo) y extracción con una jeringa de 5 mL y se guardaron en tubos estériles de 5 mL que

fueron almacenados a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico. Las muestras de la pared uterina se guardaron individualmente en bolsas hasta su procesamiento para intentar el aislamiento del virus.

3.7.5. Determinación del VSRRP en las muestras obtenidas

3.7.5.1. Preparación de las muestras

Para la obtención del suero, las muestras de sangre extraídas a los animales se dejaron coagular a temperatura ambiente y posteriormente fueron centrifugadas a 600 g a 4°C durante 10 minutos. El suero fue obtenido en condiciones de esterilidad y guardado en tubos estériles de 5 mL a -80°C hasta su utilización tanto para intentar el aislamiento vírico como para determinar la presencia de anticuerpos.

Los hisopos obtenidos fueron agitados con la ayuda de un agitador en los 2 mL de DMEM en que habían sido sumergidos y el DMEM recogido y filtrado utilizando filtros de jeringa de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro. Las muestras ya filtradas fueron almacenadas en tubos estériles a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico.

Los órganos recogidos en la necropsia se maceraron con DMEM suplementado con antibióticos en la proporción 1:9 (peso:volumen) con la ayuda de un homogenizador tipo Potter. Los macerados se centrifugaron a 1000 g durante 20 minutos para retirar los restos celulares y los sobrenadantes fueron recogidos y filtrados por filtros de jeringa de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro y fueron almacenados a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico.

Los líquidos amnióticos fueron filtrados por filtros de jeringa de $0,45\ \mu\text{m}$ de tamaño de poro y almacenados en tubos estériles de 5 mL a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico.

Los embriones fueron macerados enteros con DMEM suplementado con antibióticos en la proporción 1:9 (peso:volumen) con la ayuda de un homogenizador tipo Potter. Los macerados obtenidos fueron tratados de la misma forma que los macerados de otros órganos.

3.7.5.2. Métodos de detección de anticuerpos empleados

La presencia de anticuerpos se detectó mediante el uso de la técnica de ELISA descrita en el apartado 3.4 de este capítulo, tanto para determinar la existencia de los mismos como para titular

los sueros positivos.

3.7.5.3 Métodos de determinación vírica utilizados

Todas las muestras fueron inoculadas por cuadruplicado en placas de cultivo celular de 96 pocillos sembradas con MAP para llevar a cabo el aislamiento vírico, tal como se ha descrito en el apartado 3.1.3 de este capítulo.

3.7.6. Análisis estadísticos

Para ver si existían diferencias significativas en las tasas de concepción, el número de embriones vivos y muertos y el número de embriones infectados entre los 3 grupos en estudio se empleó la prueba del X^2 . Cuando los valores esperados eran muy pequeños y el número de individuos menor de 20 se utilizó la prueba de la probabilidad exacta de Fisher.

3.8. Diseño experimental para llevar a cabo los objetivos B.1, B.2, B.3 y B.4

Para estudiar la sintomatología asociada a la infección en las cerdas al comienzo de la gestación, el efecto de la infección por el VSRRP en el momento de la cubrición sobre las tasas de concepción y fertilización, el efecto de la infección por el VSRRP al comienzo de la gestación sobre el desarrollo embrionario y la susceptibilidad de los embriones a la infección por el VSRRP se diseñaron los siguientes experimentos:

3.8.1. Exposición al VSRRP en el día 0 de gestación

3.8.1.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos

Para este experimento se utilizaron 25 cerdas cruce de Landrace x Large White seronegativas al VSRRP, utilizando una técnica de ELISA. Las cerdas fueron mantenidas durante aproximadamente dos meses antes del inicio de la prueba en condiciones de aislamiento en grupos de 4 ó 5 animales, en establos con cama de paja. Además se utilizaron dos verracos cruce de Landrace x Large White seronegativos al VSRRP, utilizando una técnica de ELISA, de aproximadamente 11 meses de edad al inicio de la prueba, que fueron mantenidos en condiciones de aislamiento en el mismo edificio que las cerdas y fueron utilizados para la detección de celos en las mismas.

Materiales y Métodos

Todos los animales fueron alimentados durante la duración de la prueba con 2 kg/día de un pienso que contenía un 16,5% de proteína y un 72,5% de nutrientes digestibles (Nutriganse).

Diariamente se observó la ingesta de alimento y la posible presencia de signos clínicos en los animales. Además se tomaron las temperaturas rectales de todos los animales desde el día 0 hasta el momento del sacrificio de los animales.

3.8.1.2. Sincronización de celos e inseminación artificial

A partir de los 170 días de vida todas las cerdas fueron expuestas diariamente, en grupos de 4 ó 5 animales, durante unos 10 minutos por la mañana y otros 10 minutos por la tarde a la presencia de uno de los verracos utilizados para este fin. La sincronización de los celos y posteriormente la inseminación artificial se llevaron a cabo, cuando todas las cerdas habían presentado signos externos de celo al menos una vez, de la forma descrita en el apartado 3.7.2 de este capítulo.

Para llevar a cabo las inseminaciones artificiales se utilizaron dosis seminales preparadas con semen procedente de verracos seronegativos al VSRRP del centro de inseminación artificial de Proinserga SA (Segovia).

El segundo día de celo se denominó día 0.

3.8.1.3. Tratamientos empleados e inoculación experimental

Las cerdas fueron divididas en 4 grupos en el momento de la inseminación artificial:

- Grupo A, constituido por 6 cerdas, numeradas del 1 al 6, por fueron inoculadas con el VSRRP en el día 0 de gestación y fueron sacrificadas en el día 10 de gestación.
- Grupo B, formado por 6 cerdas, numeradas del 7 al 12, que sirvieron como testigos a las cerdas del grupo A y que recibieron en el momento de la inoculación el sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar con el VSRRP. Las cerdas de este grupo fueron sacrificadas en el día 10 de gestación.
- Grupo C, constituido por 6 cerdas, numeradas del 13 al 18, que fueron inoculadas con el VSRRP en el día 0 de gestación y sacrificadas en el día 20 de gestación.

Materiales y Métodos

- Grupo D, constituido por 7 cerdas, numeradas del 19 al 25, que sirvieron como testigos a las cerdas del grupo C por lo que fueron tratadas de la misma forma que ellas pero fueron inoculadas con el sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar con el VSRRP.

Las cerdas de los grupos A y C fueron inoculadas en el día 0 de gestación con 5 mL por la vía intranasal y otros 5 mL por la vía intravenosa, en la vena de la oreja con la ayuda de una palomilla de 0,65 x 20 mm (Venofix®, Braun), de un lote de virus con un título de 10^5 DI₅₀CT/mL después de la última inseminación. En total cada cerda fue inoculada con 10^6 DI₅₀CT del VSRRP. Las cerdas de los grupos B y D fueron tratadas de la misma manera pero utilizando para la inoculación el sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar. Los animales fueron sacrificados mediante sangría a muerte, previo aturdimiento con una corriente continua.

3.8.1.4. Toma de muestras

Durante el periodo del estudio se tomaron 5 muestras de sangre en las cerdas de los grupos A y B y 6 en las cerdas de los grupos C y D. Las dos primeras muestras se obtuvieron en todos los animales antes de la inoculación experimental, la primera al principio del periodo de aclimatación y la segunda 3 días antes del día de salida a celo esperado. Después de la inoculación se obtuvieron muestras de sangre en los días 3, 6 y 10 en las cerdas de los grupos A y B y en los días 3, 6, 15 y 20 en las cerdas de los grupos C y D. Todas las muestras de sangre se obtuvieron por punción de la vena yugular siguiendo el método descrito en el apartado 3.5.2 de este capítulo.

Los días de extracción de sangre se tomaron también muestras de las secreciones nasales con la ayuda de hisopos estériles, que fueron introducidos en profundidad en una de las fosas nasales. Los hisopos fueron sumergidos inmediatamente después de su obtención en tubos que contenían 2 mL de DMEM suplementado con antibióticos y fueron almacenados a -80°C hasta su procesamiento para llevar a cabo el aislamiento vírico.

En la necropsia se recogieron muestras del pulmón, las amígdalas, los ganglios linfáticos submandibulares, los ganglios linfáticos inguinales superficiales y los ganglios linfáticos uterinos. Todas las muestras fueron almacenadas individualmente en bolsas a -80°C hasta su procesamiento para intentar el aislamiento vírico.

Además, en la necropsia se recogió todo el aparato reproductor. Los ovarios se separaron del resto y los cuerpos luteos fueron contados como indicador del número de embriones esperado. Además, se recogieron en todas las cerdas muestras de la pared uterina. Tanto los ovarios como las

Materiales y Métodos

muestras de la pared del útero se guardaron individualmente a -80°C hasta su procesamiento para realizar el aislamiento vírico.

Inmediatamente después del sacrificio, en las cerdas de los grupos A y B, los cuernos uterinos fueron extendidos, cortando el mesometrio, y seccionados transversalmente en la zona de unión con el cuerpo uterino. El extremo abierto fue ocluido con la ayuda de unas pinzas de Crile y mediante una canula de polietileno se canuló el oviducto para introducir en el cuerno uterino, con la ayuda de una jeringa, 25 mL de una solución de lavado [NaCl (Merck) 137 mM; KCl (Merck) 2,68 mM; KH_2PO_4 (Merck) 1,47 mM; Na_2HPO_4 (Merck) 16,3 mM; D-glucosa (Sigma Chemical Co.) 5,55 mM y 2 g/L de BSA (Sigma Chemical Co.)] calentada previamente a 37°C al baño maría. El líquido de lavado fue desplazado por el interior del cuerno uterino hacia un lado y hacia el otro moviendo hacia arriba y hacia abajo alternativamente ambos extremos del cuerno para arrastrar en su movimiento los embriones que se encontraran en la luz del mismo. Cuando se hubo repetido este proceso varias veces se recogió el líquido sobre una placa de Petri estéril de 94 x 16 mm de diámetro (Falcon), también calentada previamente a 37°C dejando caer el líquido del interior del cuerno uterino por gravedad sobre la placa y apretando suavemente la pared del útero para extraer todo el líquido. Este proceso se repitió dos veces para recuperar el máximo número posible de embriones. Los embriones fueron identificados con la ayuda de una lupa estereoscópica (Nikon) a entre 8 y 50 aumentos y clasificados de acuerdo con su aspecto macroscópico. Después de su clasificación los embriones fueron lavados 5 veces en 2 mL de PBS estéril con la ayuda de una nueva micropipeta cada vez y almacenados a -80°C hasta su utilización para la determinación del virus en grupos de entre 4 y 6 embriones en tubos estériles con 2 mL de PBS estéril. Los líquidos utilizados para los lavados de los cuernos uterinos fueron recogidos y almacenados a -80°C hasta su procesamiento para la determinación del virus y de la presencia de anticuerpos.

En las cerdas de los grupos C y D los cuernos uterinos fueron extendidos, cortando para ello el mesometrio, y abiertos longitudinalmente por el borde antimesometrial. Los embriones presentes en el útero fueron contados, identificados de acuerdo con su posición y examinados para determinar la presencia de lesiones macroscópicas. Una vez hecho esto, todos los embriones extraídos y almacenados individualmente en bolsas a -80°C hasta su procesamiento para intentar el aislamiento del virus. Además se tomaron muestras del líquido amniótico mediante punción del saco amniótico con la ayuda de una aguja de 20 G x 1 1/2" y una jeringa de 5 mL. Los líquidos amnióticos obtenidos fueron almacenados a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento del virus.

3.8.1.5. Determinación del VSRRP en las muestras obtenidas

3.8.1.5.1. Procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre se dejaron a temperatura ambiente hasta que coagularon y se centrifugaron a 600 g a 4°C durante 10 minutos para ayudar a la retracción del coágulo. Posteriormente, las muestras de suero se extrajeron en condiciones de esterilidad y fueron almacenadas a -80°C hasta su utilización para realizar el aislamiento vírico y la determinación de la presencia de anticuerpos frente al VSRRP.

Los tubos con los hisopos nasales fueron agitados con la ayuda de un agitador y los 2 mL de DMEM recogidos con una jeringa y filtrados por un filtro de jeringa de 0,45 µm de tamaño de poro.

Las muestras de los distintos órganos recogidos en la necropsia fueron maceradas con un homogenizador tipo Potter con DMEM suplementado con antibióticos en la proporción 1:9 (peso:volumen). Los macerados fueron centrifugados a 1000 g a 4°C durante 20 minutos para eliminar los restos de tejidos y los sobrenadantes filtrados por filtros de jeringa de 0,45 µm de tamaño de poro y almacenados a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico.

Los embriones de 10 días suspendidos en 2 mL de PBS estéril fueron sometidos a 3 ciclos de congelación y descongelación para romperlos y posteriormente almacenados a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico.

Del líquido de lavado utilizado para recuperar los embriones de 10 días se separó 1 mL que fue utilizado para determinar la presencia de anticuerpos frente al VSRRP. El resto fue centrifugado a 140000 g a 4°C durante 2 horas y el sedimento fue suspendido en 2 mL de PBS estéril. Posteriormente se centrifugó a 1000 g a 4°C durante 10 minutos para quitar los restos celulares y el sobrenadante fue filtrado por filtros de jeringa de 0,45 µm de tamaño de poro y almacenado a -80°C hasta su utilización para realizar el aislamiento vírico.

Los embriones de 20 días fueron macerados enteros con DMEM suplementado con antibióticos en la proporción 1:9 (peso:volumen) con la ayuda de un homogenizador tipo Potter. Estos macerados fueron centrifugados a 1000 g a 4°C durante 20 minutos para eliminar los restos de tejidos y los sobrenadantes fueron filtrados por filtros de jeringa de 0,45 µm de tamaño de poro y almacenados a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento vírico.

Las muestras de líquido amniótico fueron filtradas por filtros de jeringa de 0,45 μm de tamaño de poro y almacenadas a -80°C hasta su utilización para intentar el aislamiento del virus.

3.8.1.5.2. Métodos de detección de anticuerpos empleados

La presencia de anticuerpos se valoró mediante el empleo de la técnica de ELISA descrita en el apartado 3.4 de este capítulo. Las muestras de suero positivas fueron tituladas utilizando esta misma técnica.

3.8.1.5.3. Métodos de detección vírica empleados

Para determinar la presencia del VSRRP en las distintas muestras recogidas se utilizó el aislamiento vírico en cultivos de MAP, tal como se describe en el apartado 3.1.3 de este capítulo. Para ello se inocularon todas las muestras por cuadruplicado en placas de 96 pocillos previamente sembradas con MAP.

3.8.1.6. Análisis estadísticos

Para ver si existían diferencias estadísticamente significativas en la tasa de concepción y en el número de embriones vivos respecto al total se utilizó la prueba del X^2 . Cuando los valores esperados eran muy pequeños y el número de casos menor de 20 se utilizó la prueba de la probabilidad exacta de Fisher.

3.8.2. Exposición al VSRRP en los días 7, 14 y 21 de gestación

3.8.2.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos

Para este estudio se utilizaron 25 cerdas cruce de Landrace x Large White sin anticuerpos frente al VSRRP medidos por una técnica de ELISA. Las cerdas fueron alojadas desde aproximadamente dos meses antes de comenzar la prueba en grupos de 4 ó 5 animales en establos aislados con cama de paja. Dos verracos cruce de Messian x Ibérico sin anticuerpos detectables frente al VSRRP mediante una técnica de ELISA fueron alojados en condiciones de aislamiento en el mismo edificio que las cerdas. Las dosis de semen para llevar a cabo la inseminación artificial provinieron de dos verracos de raza Large White, seronegativos al VSRRP mediante el empleo de una técnica de ELISA, pertenecientes al Departamento de Reproducción Animal del Instituto Nacional de Investigaciones Agrarias.

Todos los animales fueron alimentados durante toda la prueba con 2 kg/día de un pienso con un 16,5% de proteína y un 72,5% de nutrientes digestibles (Nutriganse).

Los animales fueron observados diariamente para comprobar la ingesta de alimento y la posible presencia de signos clínicos. Además, se tomaron las temperaturas rectales desde el día 0 hasta el día 21 p.i..

3.8.2.2. Sincronización de celos e inseminación artificial

Desde que las cerdas tenían aproximadamente 170 días de vida fueron expuestas al contacto directo del verraco dos veces al día por un periodo de unos 10 minutos en grupos de 4 ó 5 animales tanto para detectar los animales en celo como para estimular la llegada de la pubertad. Cuando todos los animales habían mostrado signos externos de celo al menos una vez se empezó el tratamiento de sincronización de celos, que se llevó a cabo según se ha descrito en el apartado 3.7.2 de este capítulo.

Todos los animales que mostraron signos externos de celo entre 24 y 48 horas después de finalizar el tratamiento de sincronización fueron inseminados artificialmente, utilizando semen proveniente de los dos verracos disponibles para tal fin.

Para la preparación de las dosis de semen se recogió semen, utilizando la técnica manual, a los dos verracos disponibles para este fin. El semen fue contrastado midiendo su motilidad, el porcentaje de formas anormales y la concentración espermática y las dosis espermáticas fueron preparadas utilizando una concentración de 4000×10^6 espermatozoides/dosis en un volumen total de 100 mL. Las dosis fueron preparadas diluyendo el diluyente de semen MRA® (Kubus SA) en agua destilada según las instrucciones del fabricante, añadiendo a continuación al semen contrastado la cantidad necesaria de diluyente, previamente calentado a 37°C, para alcanzar el volumen deseado. La mezcla se distribuía, una vez homogeneizada, en los fracos utilizados para llevar a cabo la inseminación artificial, previamente calentados a 37°C. Una vez rellenos los frascos se dejaban durante 3 horas a temperatura ambiente, para bajar lentamente la temperatura y se metían en una estufa a 15°C, donde se mantenían hasta su utilización. Nunca se utilizaron dosis que hubieran sido preparadas con más de 36 horas de antelación.

La inseminación artificial se llevó a cabo siguiendo el método descrito en el apartado 3.7.2 de este capítulo.

El segundo día de celo fue considerado día 0 de gestación.

3.8.2.3. Inoculación experimental

Después de la inseminación artificial los animales fueron divididos en 6 grupos:

- Grupo A, constituido por 5 cerdas, numeradas del 1 al 5, expuestas al VSRRP en el día 7 de gestación.
- Grupo B, constituido por 3 cerdas, numeradas del 6 al 8, que sirvieron de testigos a las cerdas del grupo A y que fueron expuestas al sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar en el día 7 de gestación.
- Grupo C, constituido por 6 cerdas, numeradas del 9 al 14, que fueron expuestas al VSRRP en el día 14 de gestación.
- Grupo D, constituido por 3 cerdas, numeradas del 15 al 17, que sirvieron de testigos a las cerdas del grupo C y que fueron expuestas al sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar en el día 14 de gestación.
- Grupo E, constituido por 5 cerdas, numeradas del 18 al 22, que fueron expuestas al VSRRP en el día 21 de gestación.
- Grupo F, constituido por 3 cerdas, numeradas del 23 al 25, que sirvieron de testigos a las cerdas del grupo E y que fueron expuestas al sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar en el día 21 de gestación.

Las cerdas de los grupos A, C y E fueron inoculadas por la vía intranasal con 5 mL de una suspensión vírica con un título de $3,15 \times 10^6$ DI₅₀CT/mL por lo que recibieron un total de $1,6 \times 10^7$ DI₅₀CT del VSRRP. Las cerdas de los grupos B, D y F recibieron 5 mL por la vía intranasal del sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar con el virus. Las inoculaciones se llevaron a cabo introduciendo 2,5 mL de la suspensión vírica utilizada como inóculo por cada una de las fosas nasales en el momento de la inspiración con la ayuda de una cánula de polietileno adaptada a una jeringa de cono Luer.

Todos los animales fueron sacrificados, mediante sangría a muerte previo aturdimiento con

una corriente eléctrica continua en el día 21 ± 1 p.i..

3.8.2.4. Toma de muestras

En total se tomaron 5 muestras de sangre en todas las cerdas. Las dos primeras se tomaron antes de la inoculación experimental, una en el periodo de aclimatación y la otra 3 días antes de la inoculación. Después de la inoculación con el VSRRP se tomaron muestras de sangre en los días 5, 7 y 21 p.i.. Las muestras de sangre se tomaron por punción en la vena yugular por el sistema descrito en el apartado 3.5.2. Todos los días de extracción de sangre se tomaron muestras de las secreciones nasales con la ayuda de hisopos estériles que eran introducidos en profundidad en las fosas nasales y sumergidos inmediatamente después de su obtención en tubos estériles con 2 mL de DMEM suplementado con antibióticos.

En la necropsia se recogieron muestras de los ganglios linfáticos submandibulares y del pulmón, que fueron inmediatamente congeladas a -80°C hasta su procesamiento para intentar la detección vírica. Además se recogió todo el aparato reproductor, del cual se separaron los ganglios linfáticos uterinos y los ovarios, en los cuales se contaron los cuerpos luteos presentes como indicador del número de embriones esperado. A continuación tanto los ovarios como los ganglios linfáticos uterinos fueron congelados individualmente a -80°C hasta su procesamiento para intentar la detección vírica.

Los cuernos uterinos fueron diseccionados, rompiendo el mesometrio para extenderlos y cortando transversalmente con la ayuda de unas tijeras de Mayo en la zona de unión con el cuerpo uterino. A continuación fueron abiertos por el borde antimesometrial y los embriones presentes en cada uno de los cuernos fueron contados, identificados por su posición en el útero y observados para determinar la presencia de lesiones macroscópicas, tras lo cual fueron extraídos y guardados individualmente a -80°C hasta su procesamiento para la detección vírica.

Además, se tomaron muestras de líquido amniótico mediante la punción del saco amniótico con la ayuda de una aguja de 20 G x 1 1/2" y una jeringa de 5 mL antes de extraer los embriones del útero. Estas muestras fueron almacenadas en tubos estériles de 5 mL a -80°C hasta su procesamiento para la detección del virus.

3.8.2.5. Detección del VSRRP en las muestras obtenidas

3.8.2.5.1. Procesamiento de las muestras

Las muestras de sangre se dejaron coagular a temperatura ambiente y posteriormente fueron centrifugadas a 600 g a 4°C durante 10 minutos para obtener el suero que fue extraído en condiciones de esterilidad. Este suero fue almacenado en tubos estériles a -80°C hasta su utilización para determinar la presencia del virus o de anticuerpos específicos frente al VSRRP.

Las muestras de los distintos órganos obtenidas en la necropsia fueron maceradas con DMEM suplementado con antibióticos en la proporción 1:9 (peso:volumen) con la ayuda de un homogenizador tipo Potter. Los macerados fueron centrifugados a 1000 g a 4°C durante 20 minutos para eliminar los restos de tejidos y los sobrenadantes fueron filtrados por filtros de jeringa de 0,45 μm de tamaño de poro y almacenados a -80°C hasta su utilización para determinar la presencia del virus.

Los embriones procedentes de las cerdas de los grupos A, B, C y D fueron macerados enteros con DMEM suplementado con antibióticos en la proporción 1:9 (peso:volumen) y tratados de la misma forma que las muestras de los distintos órganos. Los embriones procedentes de las cerdas de los grupos E y F fueron abiertos para extraer los órganos internos, los cuales fueron utilizados para realizarlos macerados con DMEM suplementado con antibióticos en la proporción 1:9 (peso:volumen). Estos macerados fueron tratados de la misma manera que los macerados procedentes de otras muestras.

Las muestras de líquido amniótico fueron filtradas por filtros de jeringa de 0,45 μm de tamaño de poro y almacenadas a -80°C hasta su utilización para la determinación de la presencia del virus.

3.8.2.5.2. Métodos de detección de anticuerpos utilizados

Para la detección de anticuerpos específicos frente al VSRRP en las muestras de suero se utilizaron las técnicas de IPMA y de ELISA, descritas en los apartados 3.3 y 3.4 de este capítulo respectivamente. Estas técnicas fueron empleadas tanto para la detección de muestras positivas como para la titulación de dichas muestras.

3.8.2.5.3. Métodos de detección vírica empleados

Para determinar la presencia del VSRRP se utilizaron las técnicas de aislamiento vírico y de RT-PCR.

Las pruebas de aislamiento vírico se llevaron a cabo inoculando cada muestra por duplicado en placas de cultivo celular de 24 pocillos previamente sembradas con MAP tal como se ha descrito en el apartado 3.1.3. de este capítulo.

La prueba de la RT-PCR se llevó a cabo siguiendo la técnica descrita en el apartado 3.2. de este capítulo.

3.9. Diseño experimental para llevar a cabo el objetivo B.5

Para estudiar *in vitro* el efecto que el VSRRP tiene sobre los embriones en el estadio de entre 4 y 16 células, se diseñó el siguiente experimento:

3.9.1. Animales utilizados y mantenimiento de los mismos

Para llevar a cabo este estudio se utilizaron 14 cerdas cruce de Landrace x Large White seronegativas al VSRRP por una técnica de ELISA. Durante aproximadamente dos meses antes del inicio de la prueba los animales fueron mantenidos en grupos de 3 ó 4 en condiciones de aislamiento en establos con cama de paja. Un verraco cruce de Messiah x Ibérico seronegativo al VSRRP utilizando una técnica de ELISA, de aproximadamente 11 meses de edad, fue mantenido en condiciones de aislamiento en el mismo edificio que las cerdas.

Para preparar las dosis de semen se utilizaron dos verracos Large White seronegativos al VSRRP pertenecientes al Departamento de Producciones Animales de la Escuela Técnica Superior de Ingenieros Agrónomos de la Universidad Politécnica de Madrid.

Los animales fueron alimentados durante toda su estancia con 2 kg/día de un pienso que contenía un 16,5% de proteína y un 72,5% de nutrientes digestibles (Nutriganse).

3.9.2. Virus utilizado

La incubación de los embriones en presencia del VSRRP se llevó a cabo con un lote de virus preparado según se ha especificado en el apartado 3.1.1 de este capítulo, pero, dado que los

títulos víricos obtenidos en cultivos de MAP rara vez superan las 10^6 DI₅₀CT/mL, para llevar a cabo las microinyecciones fue necesario concentrar el virus. Para ello se centrifugaron 100 mL de un lote de virus con un título inicial de $1,1 \times 10^6$ DI₅₀CT/mL a 140000 g a 4°C durante 2 horas y el sedimento se suspendió en 5 ml de PBS estéril. Posteriormente se centrifugó a 3000 g a 4°C durante 5 minutos para quitar los detritus celulares, se tituló nuevamente y se ajustó el título a 10^7 DI₅₀CT/mL con PBS estéril.

3.9.3. Sincronización de celos e inseminación artificial

Todas las cerdas fueron expuestas a la presencia del verraco durante 10 minutos por la mañana y otros 10 minutos por la tarde desde los 170 días de vida. La sincronización de los celos y la inseminación artificial de las cerdas se llevó a cabo, una vez que todas las cerdas habían mostrado signos externos de celo al menos una vez, siguiendo el procedimiento descrito en el apartado 3.7.2. de este capítulo. Las dosis de semen se prepararon siguiendo el método descrito en el apartado 3.8.2.2 de este capítulo

El segundo día de celo fue considerado día 0.

3.9.4. Recolección de los embriones

En el día 2, a las 36 horas aproximadamente de la supuesta ovulación, las cerdas fueron sacrificadas mediante una sangría a muerte tras el aturdimiento llevado a cabo por la aplicación de una corriente continua. Tras el sacrificio se recogieron los aparatos reproductores, los cuales fueron mantenidos a 37°C mediante el empleo de cajas isotérmicas hasta el momento en que se recuperaron los embriones. Una vez en el laboratorio, los ovarios fueron separados y los cuerpos luteos contados como indicador del número de embriones que deberíamos encontrar en el cuerno uterino ipsilateral. Una vez hecho esto se diseccionaron los oviductos y los cuernos uterinos, rompiendo para ello el mesometrio, y se cortaron estos últimos transversalmente en la zona de unión al cuerpo uterino. A continuación se colocaron unas pinzas Crile en el extremo abierto del cuerno uterino y, con la ayuda de una cánula de polietileno y una jeringa, se introdujeron 25 mL del medio de cultivo denominado Beltsville embryo culture medium (BECM), previamente calentado a 37°C con la ayuda de un baño maría, por el oviducto. Una vez introducido el líquido se le hizo desplazarse por el interior del cuerno uterino hacia un lado y hacia el otro moviendo hacia arriba y hacia abajo alternativamente ambos extremos del cuerno para arrastrar en su desplazamiento los embriones que se encontraran en la luz del mismo. Cuando se hubo repetido este proceso varias veces se recogió el líquido sobre una placa de Petri estéril de 94 x 16 mm de

Materiales y Métodos

diámetro (Falcon), también calentada previamente a 37°C dejando caer el líquido del interior del cuerno uterino por gravedad, colocando el extremo abierto encima de la placa. Cuando no se obtenían todos los embriones u ovocitos que deberían estar presentes en el cuerno uterino, de acuerdo al número de cuerpos luteos existentes en el ovario ipsilateral, se repetía el proceso para obtener el máximo número posible de embriones y/o ovocitos.

Los embriones así recuperados fueron visualizados con la ayuda de una lupa estereoscópica a entre 8 y 50 aumentos y trasladados a otra placa de Petri estéril de 60 x 15 mm de diámetro (Falcon) a la que se le habían añadido 5 mL de BECM previamente calentado a 37°C con la ayuda de una micropipeta. En total se recogieron 124 embriones en el estadio de entre 4 y 16 células que fueron utilizados en el experimento.

La composición del medio BECM que se utilizó para realizar los lavados es la siguiente:

Lactato sódico (Sigma Chemical Co.)	25,2 mM
Lactato cálcico (Sigma Chemical Co.)	2,14 mM
Cloruro sódico (Sigma Chemical Co.)	90 mM
Cloruro potásico (Sigma Chemical Co.)	4,83 mM
Cloruro magnésico (Sigma Chemical Co.)	0,54 mM
Bicarbonato sódico (Sigma Chemical Co.)	2,14 mM
Hepes (Sigma Chemical Co.)	10,9 mM
D-glucosa (Sigma Chemical Co.)	0,554 mM
D-manitol (Sigma Chemical Co.)	11 mM
L-glutamina (Sigma Chemical Co.)	1,03 mM
Taurina (Sigma Chemical Co.)	7,03 mM
Piruvato sódico (Sigma Chemical Co.)	0,273 mM
EDTA (Sigma Chemical Co.)	0,079 mM
Rojo fenol (Sigma Chemical Co.)	0,079 mM
Gentamicina base (Sigma Chemical Co.)	32,4 mg/L
Fracción V de la seroalbúmina bovina (BSA) (Sigma Chemical Co.)	10 g/L

Para su preparación se disolvían todos los componentes, de uno en uno y en el orden en que se han citado, en agua Nanopure con la ayuda de una barrita magnética, salvo la BSA que se dejaba disolver por sí misma. A continuación se ajustaba el pH a 7,2 con una solución de NaOH 2 N y se filtraba utilizando filtros de campana de 0,22 μ m de tamaño de poro (Acrocap®, Gelman).

Las micropipetas se prepararon manualmente utilizando para ello pipetas Pasteur (Chase

Instruments) a las que se les calentaba la punta a la llama, extirrándola posteriormente antes de que se enfriara para conseguir una punta con un diámetro externo de aproximadamente 1 mm. Estas pipetas Pasteur así preparadas se conectaban a un tubo de silicona de aproximadamente 1 m de longitud en el que se había interpuesto un filtro de jeringa para evitar posibles contaminaciones y que terminaba en una boquilla para absorber o expeler el líquido.

3.9.5. Exposición de los embriones al VSRRP

En las dos horas siguientes a la recolección, los embriones procedentes de las distintas cerdas fueron mezclados y divididos al azar en 4 grupos, colocando aproximadamente el mismo número de embriones de cada uno de los estadios utilizados en el estudio en cada grupo. El tratamiento que recibió cada uno de los grupos fue el siguiente:

- Grupo 1: los embriones pertenecientes a este grupo fueron incubados en presencia del VSRRP. Para ello, al medio de cultivo empleado para cultivar los embriones se le habían añadido $4,45 \times 10^5$ DI₅₀CT del VSRRP.
- Grupo 2: los embriones pertenecientes a este grupo sirvieron como testigos a los embriones del grupo anterior y fueron cultivados de la misma manera, pero en ausencia del VSRRP.
- Grupo 3: los embriones pertenecientes a este grupo fueron expuestos al VSRRP, no en el medio de cultivo sino en el interior de la *zona pellucida*. Para ello los embriones fueron sometidos a una técnica de microinyección que permitía atravesar la *zona pellucida* e inyectar el virus en su interior, pero fuera de los blastómeros. Para la micromanipulación se utilizó un micromanipulador y un microscopio invertido (Nikon) con una magnificación de 100 aumentos. Para el micromanipulador se utilizaron microagujas comerciales (Femtotips®, Eppendorf) con un diámetro de apertura de $0,5 \pm 0,2 \mu\text{m}$ y micropipetas fabricadas por nosotros con la ayuda de una microforja y un pulidor de micropipetas. Cada embrión recibió entre 1 y 2 nL del lote de virus preparado con un título de 10^7 DI₅₀CT/mL, lo que significa que cada embrión fue expuesto a entre 10 y 20 DI₅₀CT del VSRRP.
- Grupo 4: los embriones pertenecientes a este grupo fueron utilizados como testigos de los embriones del tercer grupo y fueron manipulados de la misma forma, salvo que en lugar de ser inoculados con el virus fueron inoculados con PBS estéril.

Para su cultivo los embriones fueron trasladados en grupos de 4 ó 5 a placas de cultivo celular de 4 pocillos (Nunc) que contenían 0,5 mL por pocillo del medio de cultivo BECM-3

Materiales y Métodos

(Dobrinisky y Johnson, 1994) con la modificación de la exclusión de la fracción V de la BSA en su formulación. Los tres primeros pocillos fueron utilizados para lavar los embriones y en el cuarto fueron cultivados durante toda la duración de la prueba. Los embriones fueron mantenidos a 37°C en una atmósfera de 5% de CO₂ en aire durante 72 horas.

La composición de medio de cultivo utilizado para mantener los embriones es la siguiente:

Cloruro sódico (Sigma Chemical Co.)	94,8 mM
Cloruro potásico (Sigma Chemical Co.)	6,04 mM
Sulfato magnésico (Sigma Chemical Co.)	1,18 mM
Cloruro cálcico (Sigma Chemical Co.)	1,70 mM
Bicarbonato sódico (Sigma Chemical Co.)	25,1 mM
D-glucosa (Sigma Chemical Co.)	5,55 mM
L-glutamina (Sigma Chemical Co.)	1,03 mM
Piruvato sódico (Sigma Chemical Co.)	0,364 mM
Lactato sódico (Sigma Chemical Co.)	23,5 mM
Rojo fenol (Sigma Chemical Co.)	0,003 mM

Para su preparación se disolvían todos los componentes en agua Nanopure y se suplementaba con 15 mL/L de una solución de aa no esenciales MEM (Sigma Chemical Co.) y con 20 mL/L de una solución de aa BME (Sigma Chemical Co.). Posteriormente se ajustaba la osmolaridad a 290 mOsm y el pH a 7,2 y se filtraba por filtros de campana de 0,22 µm de tamaño de poro.

3.9.6. Estudio del efecto del VSRRP sobre el desarrollo embrionario

Pasadas las 72 horas de cultivo los embriones fueron estudiados a entre 8 y 50 aumentos con la ayuda de una lupa estereoscópica para determinar el grado de desarrollo que habían alcanzado. El efecto de la exposición de los embriones al VSRRP sobre el desarrollo embrionario fue llevado a cabo comparando el desarrollo alcanzado por los embriones de los grupos testigos con el alcanzado por los embriones expuestos al virus. Los criterios seguidos para valorar el desarrollo embrionario *in vitro* fueron los siguientes:

1. Los embriones que seguían en el mismo estado de desarrollo en que fueron obtenidos o que estaban degenerando, a juzgar por su morfología, se clasificaron como embriones no desarrollados.

2. Los embriones que habían llevado a cabo 1 ó 2 divisiones, es decir, los que, por ejemplo habían pasado de 4 a 8 ó 16 células, se clasificaron como embriones con desarrollo moderado.
3. Los embriones que habían alcanzado el estado de mórula o blastocisto se clasificaron como embriones con un grado de desarrollo avanzado.

Las diferencias entre los distintos grupos fueron analizadas utilizando una prueba de χ^2 .

3.9.7. Determinación del VSRRP en los embriones

3.9.7.1. Preparación de los embriones

Al cabo de 72 horas de cultivo, y después de haber valorado el grado de desarrollo alcanzado por los distintos grupos de embriones, éstos fueron lavados para eliminar los posibles restos de virus en los embriones cultivados en presencia de virus y para quitar los restos del medio de cultivo en los demás. Para ello se pasaron los embriones, en los grupos en que fueron cultivados, 10 veces (en el caso de los embriones cultivados en presencia del virus) ó 5 veces (en el resto de los embriones) a un pocillo nuevo cada vez que contenía 2 mL de PBS estéril. Para realizar los lavados se utilizaron placas de cultivo celular de 24 pocillos y una micropipeta nueva para cada uno de ellos. Se estimó que cada lavado suponía una dilución 1:100 del medio en que habían sido cultivados los embriones.

Después del lavado de los embriones, 7 de los que habían sido incubados en presencia del VSRRP y 5 de sus testigos y 4 de los que habían sido microinyectados con el VSRRP y 4 de sus testigos fueron utilizados para realizar una técnica de IFD y el resto fueron congelados, en grupos de 4 ó 5 a -80°C con 2 mL de PBS estéril. Estos embriones fueron sometidos a 3 ciclos de congelación y descongelación para romper los embriones. Las muestras preparadas de esta manera fueron utilizadas para la detección vírica.

3.9.7.2. Técnicas de detección vírica empleadas

Para la detección vírica se emplearon las técnicas de aislamiento vírico, la técnica de RT-PCR y la técnica de la IFD.

El aislamiento vírico se llevó a cabo inoculando todas las muestras de embriones por duplicado en placas de cultivo celular de 24 pocillos sembradas previamente con MAP siguiendo el

método descrito en el apartado 3.1.3 de este capítulo.

La técnica de RT-PCR se llevó a cabo siguiendo el método descrito en el apartado 3.2. de este capítulo.

Para la realización de la técnica de la IFD los embriones se secaron al aire en portaobjetos excavados (Menzel-Glaser) que habían sido desengrasados previamente. Después se fijaron en acetona (Merck) fría durante 20 minutos. Pasado este tiempo se añadieron 100 μ L de un anticuerpo monoclonal desarrollado frente a la proteína codificada por la ORF-7 del VSRRP, cedido por el Dr. Antonio Sanz (Ingenasa), a la dilución 1:800 y se incubaron los portaobjetos en una cámara húmeda a 37°C durante 45 minutos. Al cabo de este tiempo los embriones fueron lavados en PBS con la ayuda de una micropipeta para eliminar los restos del anticuerpo monoclonal. Posteriormente se añadieron a los portaobjetos donde se habían colocado de nuevo los embriones 100 μ L de un suero anti-IgG de ratón producido en conejo y conjugado con isotiocianato de fluoresceína (Sigma Chemical Co.). Los portaobjetos se incubaron de nuevo en cámara húmeda durante 45 minutos a 37°C. Después de esta segunda incubación se lavaron nuevamente los embriones con PBS para eliminar los restos del conjugado, se colocaron en un portaobjetos, se añadió una gota de fluoprep® (Bio Mérieux) y se cubrió con un cubreobjetos desengrasado. Las preparaciones fueron observadas en un microscopio de fluorescencia (Nikon) a 40 aumentos para observar la presencia de fluorescencia específica en los embriones.

IV. RESULTADOS

4.1. Estudio de la infección por el VSRRP en el verraco: sintomatología asociada a la misma, efecto sobre la calidad espermática y eliminación del virus por la vía seminal (objetivos A.1, A.2 y A.3)

4.1.1. Signos clínicos observados

Ninguno de los verracos del grupo A (verracos del 2 al 6) mostró ningún síntoma de padecer un proceso respiratorio, permaneciendo normales durante todo el experimento. Tampoco mostraron trastornos en el apetito, comiendo normalmente su ración diaria de pienso. Las temperaturas rectales durante el periodo de estudio se muestran a la tabla 1, en la cual se puede observar un ligero aumento después de la inoculación con el VSRRP, aunque este aumento sólo fue estadísticamente significativo en el caso de los verracos 2, 4 y 5. Sin embargo, sólo el verraco número 6 superó los $39,7^{\circ}\text{C}$, temperatura por encima de la cual establecimos que se podía considerar que el animal tenía fiebre, y fue solamente en el día 2 p.i., como se muestra en las figuras 1, 2, 3, 4 y 5, que muestran las temperaturas rectales de los verracos 2, 3, 4, 5 y 6 respectivamente.

En el grupo B, todos los animales, salvo el verraco número 7, permanecieron normales a lo largo del periodo de estudio. El verraco número 7 por el contrario, presentó depresión y anorexia durante los días 1, 2 y 3 p.i., rehusando subir al potro en el día 3 p.i.. En cuanto a las temperaturas rectales, los verracos de este grupo también mostraron un ligero aumento en los días que siguieron a la inoculación con el VSRRP, como se puede observar en la tabla 2, donde se muestran dichas temperaturas antes y después de la inoculación con el VSRRP. El análisis estadístico de las mismas mostró diferencias significativas entre las temperaturas obtenidas antes y después de la inoculación experimental. Sin embargo, tal como se observa en las figuras 6, 7, 8 y 9, que muestran las temperaturas rectales de los verracos, 7, 8, 9 y 10 respectivamente, sólo los verracos 7, 9 y 10 alcanzaron en una ocasión una temperatura considerada febril, siendo de $39,8^{\circ}\text{C}$ en el caso de los verracos 7 y 10 y de $40,0^{\circ}\text{C}$ en el caso del verraco número 9.

Los verracos del grupo C permanecieron normales a lo largo de todo el experimento. La tabla 3 y las figuras 10 y 11 muestran las temperaturas rectales de los animales de este grupo, las cuales permanecieron dentro de los límites de la normalidad, con la única excepción del verraco número 11, el cual en el día 10 antes de la inoculación experimental mostró una temperatura rectal de $39,8^{\circ}\text{C}$ sin que mostrara ninguna otra sintomatología ni podamos atribuir a ningún factor conocido este aumento. Sin embargo, no existieron diferencias estadísticamente significativas en las temperaturas rectales de los verracos de este grupo antes y después de la inoculación con el sobrenadante de un cultivo de MAP.

Resultados

Tabla 1. Temperaturas rectales de los verracos del grupo A antes y después de la inoculación con el VSRP

DÍA	VERRACO N° 2		VERRACO N° 3		VERRACO N° 4		VERRACO N° 5		VERRACO N° 6	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
0	37,0	37,0*	37,9	37,9*	36,0	36,0*	37,4	37,4*	38,4	38,4*
1	38,3	37,7	37,8	38,2	36,5	37,3	37,8	36,7	38,3	37,6
2	37,8	39,2	38,5	39,5	37,4	38,9	37,9	39,2	38,1	40,8
3	38,3	38,6	38,2	38,3	37,6	38,5	38,4	38,1	38,4	38,6
4	38,7	39,1	38,5	38,5	37,9	39,4	38,3	39,3	38,5	39,0
5	38,1	39,3	38,0	38,6	38,1	39,0	38,5	38,6	38,7	38,7
6	38,3	39,2	38,6	38,2	37,9	38,1	38,2	39,2	38,5	37,8
7	36,5	38,1	37,9	38,2	37,0	37,7	38,2	38,4	37,9	38,9
8	38,1	39,0	38,8	38,7	37,5	38,7	38,2	38,5	38,5	38,5
9	37,9	38,7	38,6	38,3	38,0	38,7	37,7	38,8	38,6	39,2
10	37,5	38,8	38,2	39,0	37,0	38,4	38,2	38,4	38,7	38,7
11	38,1	38,7	39,2	38,2	38,3	37,8	38,5	38,9	38,9	38,8
12	38,2	39,0	38,8	38,3	37,8	37,7	37,5	38,4	37,6	37,6
13	38,7	38,3	38,3	38,1	37,3	37,5	38,2	37,9	38,5	38,3
14	38,8	38,1	38,5	38,2	37,7	37,3	38,3	37,8	38,6	38,1
15	38,1	38,7	37,9	38,5	38,2	37,7	37,9	38,0	38,8	37,9
16	37,7	38,3	37,0	38,3	38,8	37,5	38,2	38,3	38,3	38,7
17	37,3	38,5	36,5	38,4	36,5	38,1	37,9	38,0	38,5	38,6
18	38,2	38,3	37,6	38,2	37,0	37,8	38,4	38,4	38,1	38,5
19	37,9	38,3	37,7	37,9	37,4	38,0	38,3	38,3	38,7	38,4
20	38,4	37,9	38,3	37,5	38,0	37,0	38,3	38,1	39,3	38,3
21	38,4	38,4	38,1	38,2	37,5	38,0	38,6	38,2	38,1	38,7
22	38,4	38,1	38,4	38,3	37,5	38,4	37,9	38,3	38,0	38,4
23	38,8	38,0	38,8	38,4	37,7	38,3	38,3	38,4	38,6	38,8
24	38,7	37,8	38,6	38,0	38,3	38,4	38,0	38,5	38,2	38,1
25	38,6	37,8	38,0	38,4	37,6	38,4	37,9	38,5	38,8	38,3
26	37,7	38,5	37,9	38,5	37,2	38,2	38,3	38,3	38,1	38,2
27	38,3	38,4	38,0	38,7	38,7	38,3	38,2	38,7	38,9	38,2
28	38,1	38,8	37,0	38,3	36,9	38,6	38,2	38,7	38,9	38,5
29	NT	38,6	NT	38,7	NT	38,1	NT	38,5	NT	39,2
30	NT	38,2	NT	38,5	NT	38,3	NT	38,4	NT	39,2
31	NT	38,5	NT	38,6	NT	38,4	NT	38,4	NT	38,6
32	NT	38,5	NT	38,7	NT	38,4	NT	38,2	NT	38,6
33	NT	38,5	NT	38,0	NT	38,2	NT	38,0	NT	38,9
34	NT	38,7	NT	38,5	NT	37,7	NT	37,9	NT	38,6
35	NT	38,2	NT	38,3	NT	38,0	NT	38,6	NT	38,5
36	NT	38,8	NT	38,6	NT	38,5	NT	38,6	NT	39,0
37	NT	38,7	NT	38,5	NT	37,8	NT	38,4	NT	38,1
38	NT	38,4	NT	37,8	NT	38,0	NT	38,1	NT	38,1
39	NT	38,7	NT	37,5	NT	37,2	NT	38,2	NT	38,3
40	NT	38,1	NT	38,0	NT	37,8	NT	38,2	NT	38,9
41	NT	38,2	NT	38,0	NT	38,3	NT	39,1	NT	38,0
42	NT	38,0	NT	38,2	NT	37,8	NT	38,3	NT	38,9
43	NT	38,1	NT	38,6	NT	38,2	NT	38,2	NT	38,6
44	NT	38,5	NT	38,9	NT	37,3	NT	38,2	NT	38,3
45	NT	37,7	NT	38,6	NT	37,0	NT	37,3	NT	37,5
46	NT	38,3	NT	38,7	NT	37,3	NT	38,1	NT	38,3
47	NT	38,5	NT	38,7	NT	37,5	NT	38,2	NT	38,3
48	NT	38,5	NT	38,6	NT	38,4	NT	38,3	NT	38,7
49	NT	38,4	NT	38,7	NT	37,4	NT	38,2	NT	38,3

*: en el día 0 las temperaturas se tomaron antes de llevar a cabo la inoculación con el VSRP.

NT: temperatura no tomada.

Resultados

Tabla 2. Temperaturas rectales de los verracos del grupo B antes y después de la inoculación con el VSRRP

DÍA	VERRACO N° 7		VERRACO N° 8		VERRACO N° 9		VERRACO N° 10	
	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después	Antes	Después
0	36,5	36,5*	37,8	37,8*	38,1	38,1*	37,4	37,4*
1	38,2	37,3	37,8	38,7	38,4	38,2	37,8	38,2
2	37,9	37,0	38,2	38,0	38,5	38,4	38,3	39,3
3	38,0	39,0	38,3	39,7	38,4	40,0	38,1	37,7
4	38,1	38,3	38,6	38,8	38,7	38,4	38,3	38,2
5	38,0	38,6	38,9	39,0	39,0	39,0	38,5	39,8
6	38,2	38,6	38,6	38,7	38,4	38,9	38,0	38,2
7	37,9	39,2	38,2	38,5	38,2	38,2	37,0	39,5
8	38,5	38,4	38,6	38,2	38,3	38,9	38,1	39,3
9	37,8	38,2	38,7	38,2	38,2	38,4	38,0	39,0
10	37,3	37,3	38,4	38,0	38,5	38,8	37,6	38,0
11	37,8	39,2	38,8	38,4	38,6	38,3	37,8	38,9
12	36,4	39,8	38,5	37,4	38,1	38,5	37,7	38,6
13	37,1	38,7	38,8	38,4	38,4	38,3	37,3	38,7
14	37,6	38,0	38,6	38,2	37,9	38,3	37,3	38,3
15	37,8	38,7	37,8	37,5	38,6	37,5	37,0	38,3
16	37,2	38,0	38,1	38,1	37,8	38,1	37,6	38,3
17	36,5	37,8	38,0	37,9	38,0	38,3	37,5	38,2
18	37,1	37,8	37,8	38,3	37,8	38,0	38,3	38,3
19	37,9	39,4	38,0	38,3	38,3	38,6	37,3	38,7
20	37,9	38,5	38,5	37,9	37,7	38,3	38,1	38,4
21	37,7	37,8	38,5	38,2	37,8	38,7	37,8	38,3
22	37,9	38,0	38,2	38,6	38,4	38,9	38,3	38,3
23	38,5	37,8	38,4	38,1	38,0	39,2	38,1	38,2
24	38,0	37,8	38,8	38,5	38,6	38,9	37,5	38,4
25	38,2	37,4	38,7	38,6	38,3	38,7	38,1	38,3
26	37,2	37,8	37,8	38,4	38,4	38,7	37,3	38,3
27	37,8	38,0	38,6	38,5	38,2	38,6	37,7	38,0
28	37,0	38,2	37,8	38,6	37,4	38,3	37,2	38,1
29	NT	38,3	NT	38,3	NT	38,2	NT	38,3
30	NT	38,0	NT	38,3	NT	38,5	NT	38,7
31	NT	38,0	NT	38,8	NT	38,5	NT	38,5
32	NT	38,0	NT	38,3	NT	38,2	NT	38,3
33	NT	37,8	NT	38,4	NT	38,4	NT	38,2
34	NT	37,8	NT	38,6	NT	38,4	NT	38,3
35	NT	38,2	NT	38,3	NT	38,6	NT	38,2
36	NT	38,1	NT	38,1	NT	38,7	NT	38,3
37	NT	38,0	NT	38,3	NT	38,4	NT	38,3
38	NT	38,3	NT	38,4	NT	38,6	NT	38,4
39	NT	38,2	NT	38,1	NT	38,5	NT	38,4
40	NT	38,5	NT	38,3	NT	38,5	NT	37,9
41	NT	39,2	NT	38,4	NT	38,7	NT	38,3
42	NT	38,8	NT	37,5	NT	38,5	NT	37,8
43	NT	38,8	NT	38,5	NT	38,3	NT	38,0
44	NT	38,8	NT	38,4	NT	38,6	NT	38,2
45	NT	37,5	NT	38,2	NT	38,3	NT	38,1
46	NT	38,0	NT	38,3	NT	38,3	NT	37,5
47	NT	38,1	NT	38,0	NT	38,4	NT	38,2
48	NT	38,5	NT	38,5	NT	38,6	NT	38,2
49	NT	38,0	NT	38,2	NT	38,4	NT	38,1

*: en el día 0 las temperaturas se tomaron antes de llevar a cabo la inoculación experimental con el VSRRP.

NT: temperatura no tomada.

Resultados

Tabla 3. Temperaturas rectales de los verracos del grupo C antes y después de la inoculación con el VSRRP

DÍA	VERRACO N° 11		VERRACO N° 12	
	Antes	Después	Antes	Después
0	38,0	38,0*	38,0	38,0*
1	39,0	38,5	38,0	37,5
2	38,0	38,0	38,5	38,0
3	38,2	38,0	38,8	37,9
4	38,4	38,2	38,6	38,0
5	38,0	38,0	38,0	39,0
6	39,0	38,5	37,0	38,5
7	38,5	38,0	38,0	38,0
8	39,0	38,5	38,0	37,5
9	38,5	38,5	38,5	38,0
10	39,8	38,2	38,2	38,3
11	38,2	38,2	38,8	38,5
12	38,0	38,0	37,0	38,5
13	38,0	38,5	37,0	38,7
14	39,0	39,0	38,0	38,8
15	39,5	38,0	37,8	39,0
16	38,0	38,5	38,0	38,0
17	37,4	37,0	38,0	37,6
18	37,5	36,5	38,5	36,0
19	38,0	38,5	38,0	38,0
20	38,5	38,0	38,5	38,1
21	38,0	37,9	38,0	37,8
22	37,3	38,0	38,9	38,0
23	37,8	38,5	38,4	37,5
24	38,0	38,5	39,3	38,6
25	38,2	39,0	38,4	38,0
26	38,3	39,0	38,6	38,5
27	38,4	38,1	38,0	38,0
28	38,0	38,3	38,5	38,5
29	NT	39,5	NT	38,2
30	NT	38,0	NT	38,1
31	NT	38,5	NT	38,0
32	NT	38,0	NT	38,0
33	NT	37,5	NT	38,5
34	NT	38,5	NT	37,9
35	NT	38,5	NT	37,9
36	NT	38,6	NT	38,5
37	NT	38,0	NT	39,0
38	NT	38,4	NT	38,4
39	NT	38,2	NT	38,1
40	NT	38,0	NT	37,5
41	NT	38,5	NT	38,6
42	NT	38,0	NT	38,5
43	NT	38,2	NT	38,0
44	NT	37,9	NT	38,2
45	NT	38,1	NT	38,0
46	NT	38,3	NT	38,5
47	NT	38,5	NT	38,2
48	NT	38,6	NT	38,6
49	NT	38,4	NT	38,4

*: en el día 0 las temperaturas se tomaron antes de la inoculación experimental con el sobrenadante de un cultivo de MAP sin inocular.
NT: temperatura no tomada.

Resultados

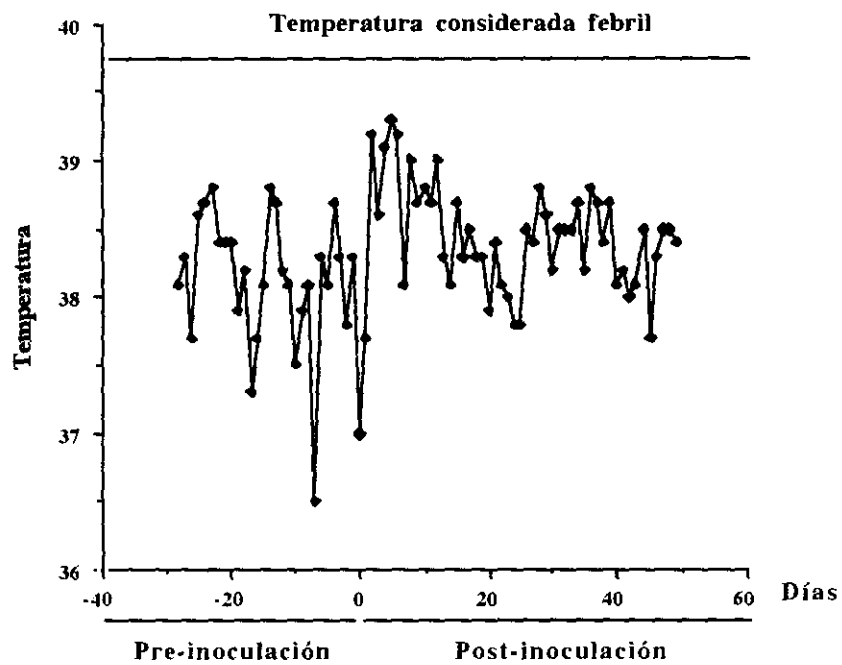


Figura 1. Temperaturas rectales del verraco número 2, perteneciente al grupo A, durante el periodo de estudio.

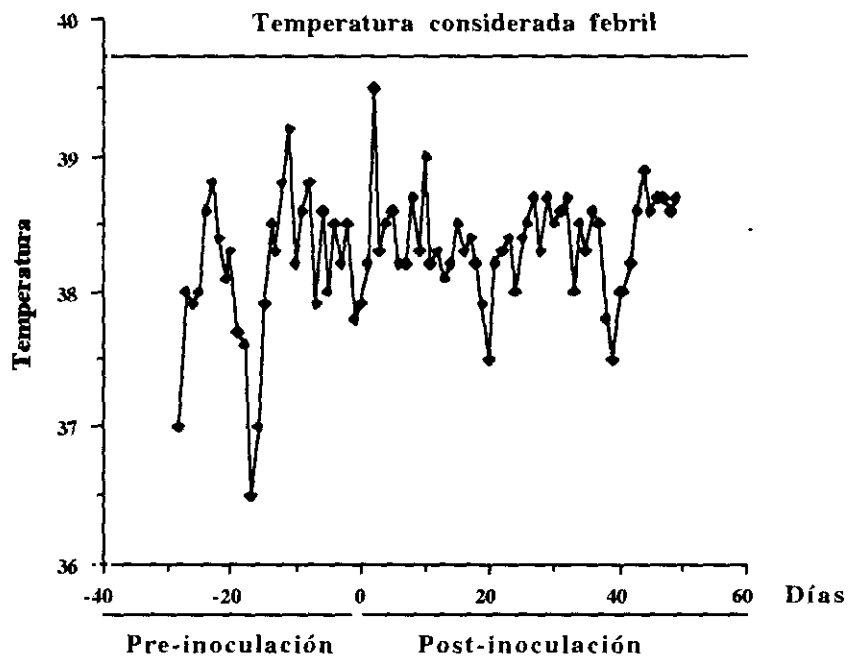


Figura 2. Temperaturas rectales del verraco número 3, perteneciente al grupo A, durante el periodo de estudio.

Resultados

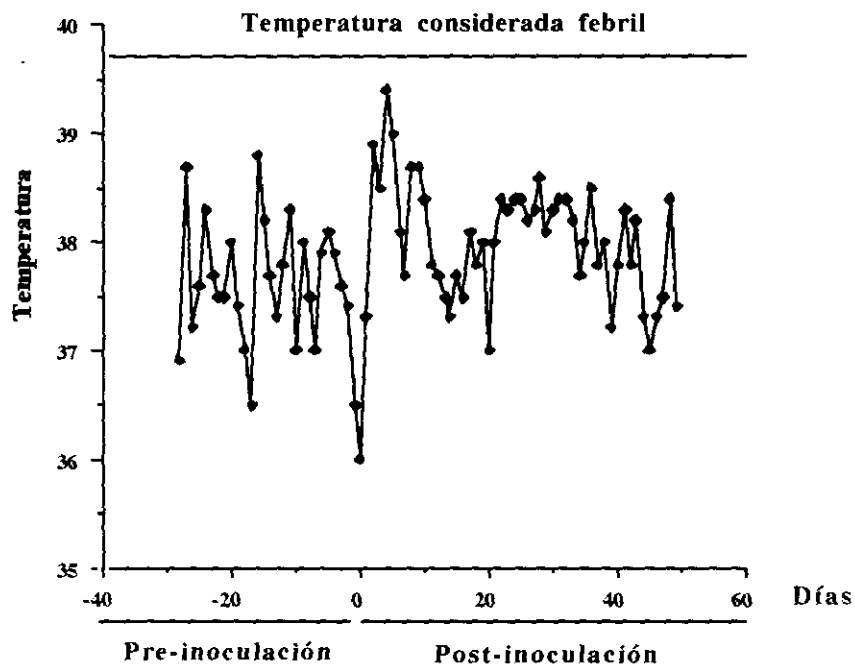


Figura 3. Temperaturas rectales del verraco número 4, perteneciente al grupo A, durante el periodo de estudio.

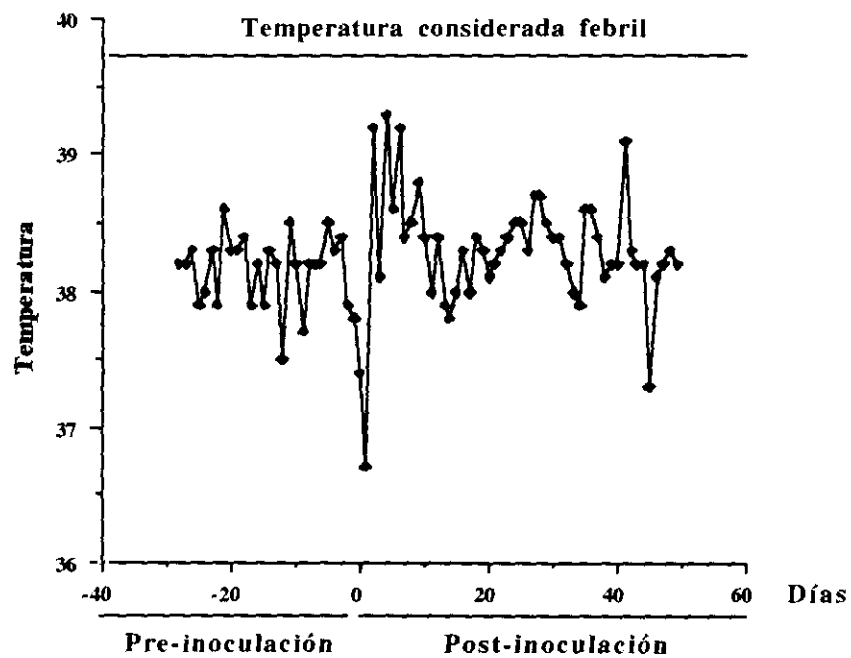


Figura 4. Temperaturas rectales del verraco número 5, perteneciente al grupo A, durante el periodo de estudio.

Resultados

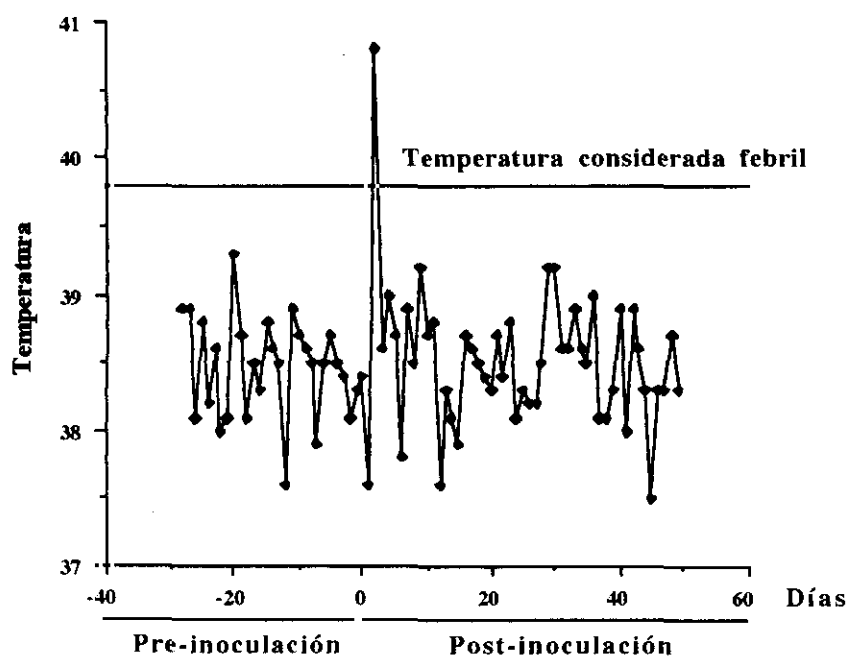


Figura 5. Temperaturas rectales del verraco número 6, perteneciente al grupo A, durante el periodo de estudio.

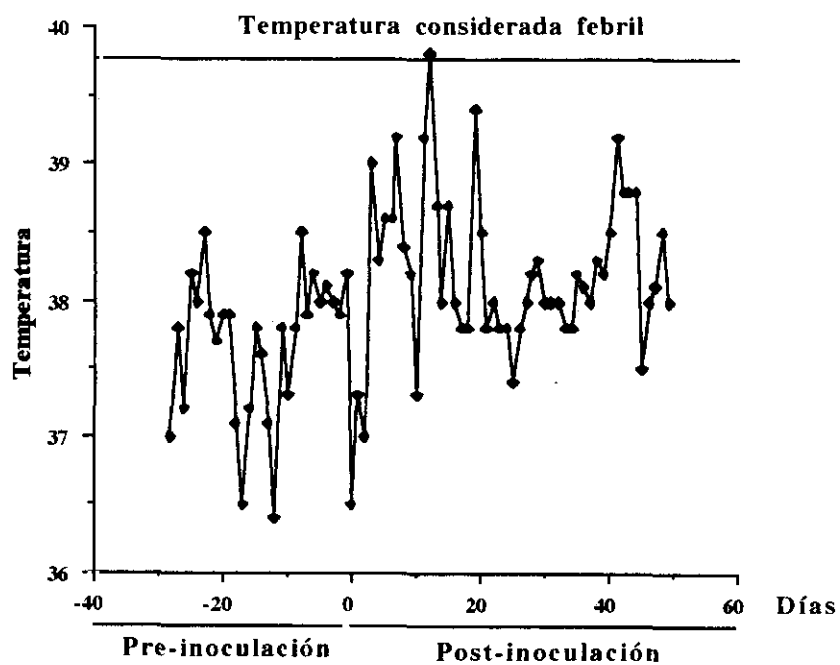


Figura 6. Temperaturas rectales del verraco número 7, perteneciente al grupo B, durante el periodo de estudio.

Resultados

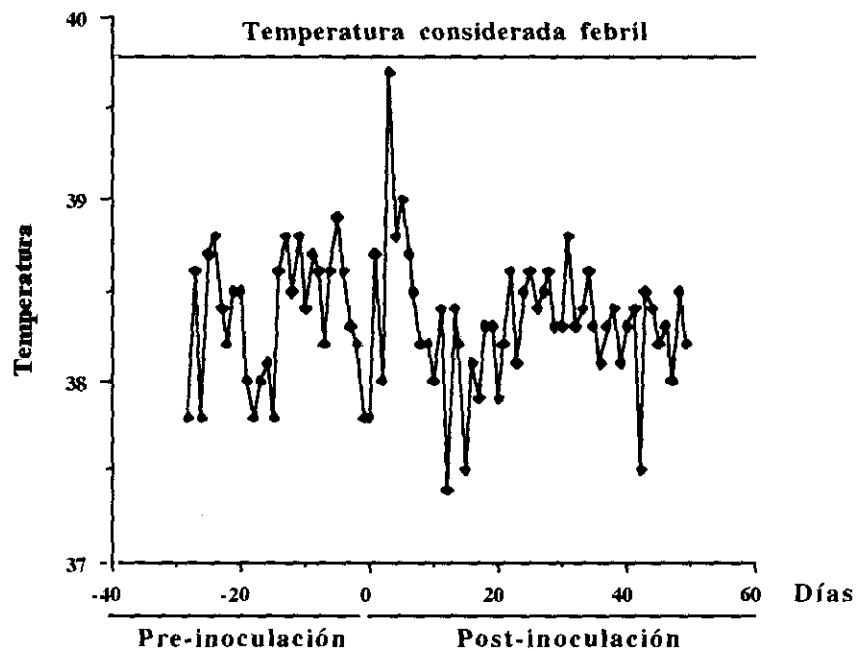


Figura 7. Temperaturas rectales del verraco número 8, perteneciente al grupo B, durante el periodo de estudio.

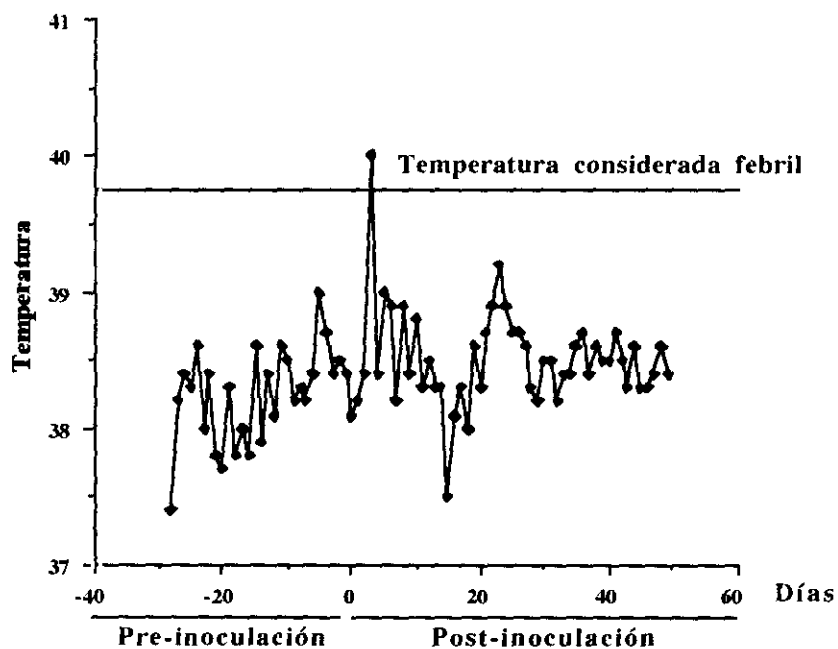


Figura 8. Temperaturas rectales del verraco 9, perteneciente al grupo B, durante el periodo de estudio.

Resultados

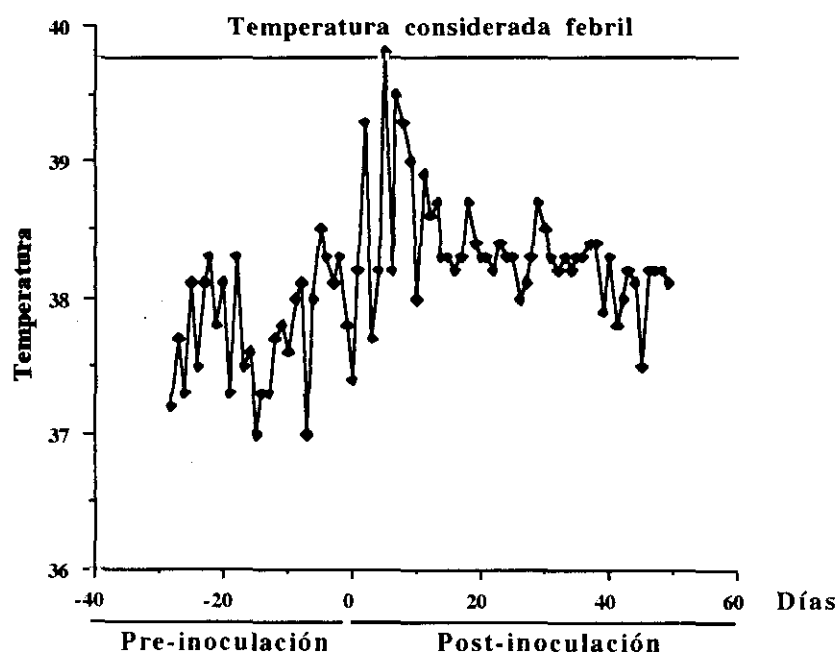


Figura 9. Temperaturas rectales del verraco número 10, perteneciente al grupo B, durante el periodo de estudio.

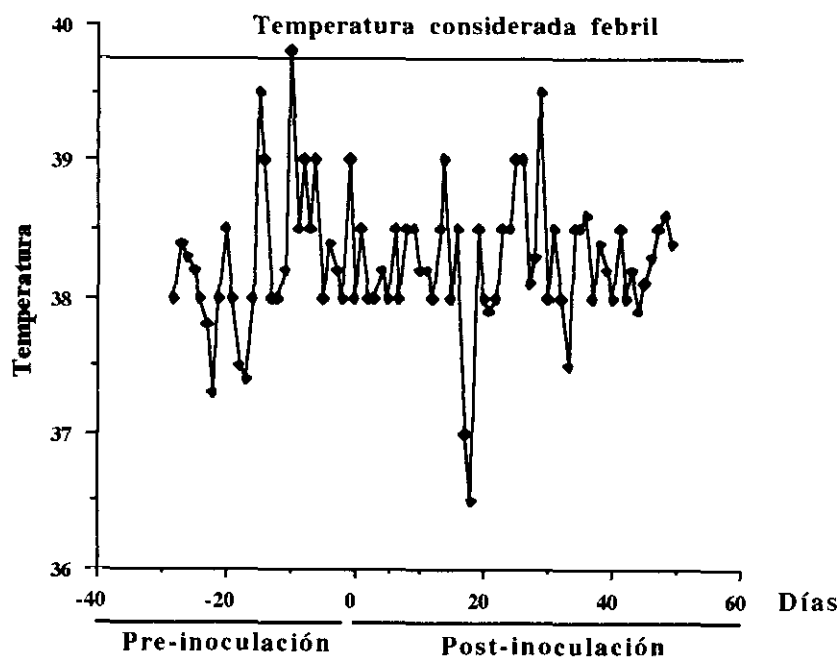


Figura 10. Temperaturas rectales del verraco número 11, perteneciente al grupo C, durante el periodo de estudio.

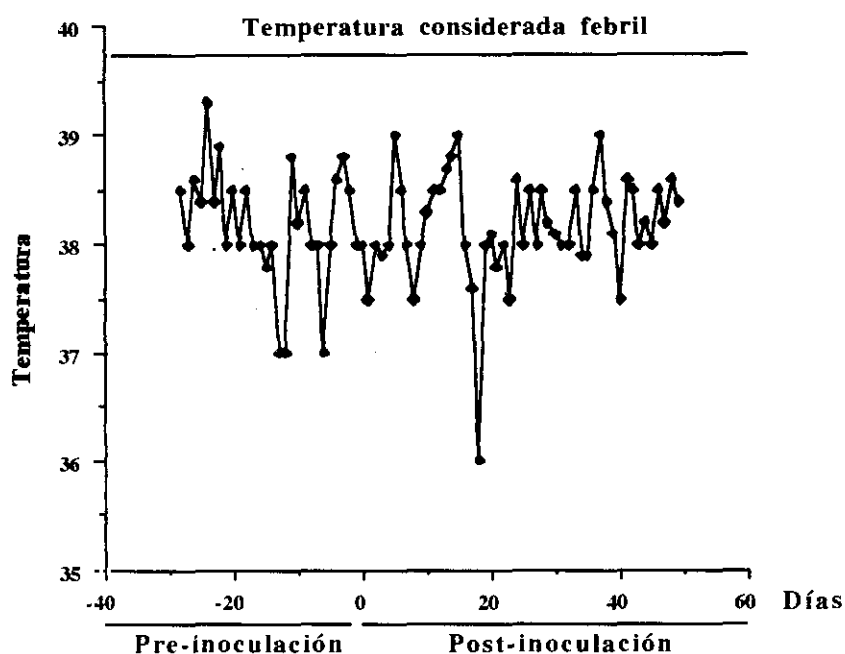


Figura 11. Temperaturas rectales del verraco número 12, perteneciente al grupo C, durante el periodo de estudio.

4.1.2. Efecto de la inoculación con el VSRRP sobre la calidad espermática

Los resultados obtenidos en las valoraciones de semen para cada uno de los verracos utilizados en este estudio, tanto antes como después de la inoculación con el VSRRP, se muestran en las tablas de la 4 a la 14. Las tablas 15, 16 y 17 muestran los valores medios obtenidos en el grupo A, el grupo B y el grupo C respectivamente, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Como se puede observar en las tablas, el volumen total del eyaculado, así como el volumen de la fracción rica y el volumen de la fracción pobre, varían mucho a lo largo del periodo de estudio, aunque existe una tendencia generalizada a que se produzca un aumento en los mismos, como consecuencia del aumento en la edad de los animales. Sin embargo, esta diferencia sólo es estadísticamente significativa en los verracos de los grupos A y B si consideramos el volumen total del eyaculado y el volumen de la fracción pobre y en los verracos del grupo A si consideramos el volumen de la fracción rica ($p < 0,01$ en todos los casos). En cuanto a la concentración total de espermatozoides, también se observa una gran oscilación en los valores obtenidos en los distintos animales a lo largo del periodo de estudio, existiendo, también en este caso, una tendencia al aumento, la cual es estadísticamente significativa en el caso de los verracos del grupo A ($p < 0,05$).

Resultados

El análisis del porcentaje de espermatozoides móviles en los verracos del grupo A reveló una disminución estadísticamente significativa ($p < 0,01$) después de la inoculación con el VSRRP (con un 15,8% menos de espermatozoides móviles como media) desde el día 14 hasta el día 42 p.i., volviéndose posteriormente a los valores que presentaban antes de la inoculación con el VSRRP. Si observamos los valores obtenidos para cada verraco de forma individual se aprecia que esta disminución se ha producido en 4 de los 5 verracos pertenecientes a este grupo (verracos 2, 4, 5 y 6) con una disminución media del 27,5%; el 9,4%; el 21,9% y el 13,8% respectivamente.

El análisis estadístico del porcentaje medio de espermatozoides móviles en el grupo B no reveló ninguna diferencia estadísticamente significativa entre los valores obtenidos antes y después de la inoculación experimental. Sin embargo, se produjo una disminución media del porcentaje de espermatozoides móviles del 8,1% después de la inoculación con el VSRRP. Si se tienen en cuenta los datos obtenidos en cada uno de los animales pertenecientes a este grupo de forma individual, se puede apreciar que hubo 2 animales que mostraron una disminución más acusada (verracos 7 y 9, con disminuciones del 13,1% y del 10,6% respectivamente), siendo ésta mayor entre los días 7 y 35 p.i.. Por el contrario, los 2 verracos restantes de este grupo sólo mostraron una disminución muy moderada en los valores medios de espermatozoides móviles, siendo del 3,8% en el verraco 8 y del 5,6% en el verraco 10, observándose una disminución más marcada entre los días 14 y 28 p.i..

Cuando se compararon estadísticamente los porcentajes de espermatozoides móviles en los verracos del grupo C antes y después de la inoculación con el sobrenadante de un cultivo de MAP sin infectar no se observó ninguna diferencia entre los valores obtenidos antes y después de la misma. Estudiando individualmente a los animales de este grupo se observa que ambos mantienen valores muy similares para este parámetro antes y después de la inoculación experimental, disminuyendo un 0,45% en el verraco 11 y aumentando un 3,9% en el verraco 12.

Los porcentajes medios de espermatozoides móviles para los grupos A, B y C antes y después de la inoculación experimental con el VSRRP se representan en la figura 12. En ella se observa la disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles que se produce entre los días 14 y 42 en el grupo A y en menor medida en el grupo B.

En cuanto a las alteraciones en la morfología de los espermatozoides, no se observaron diferencias en el porcentaje de espermatozoides con anomalías en la morfología de la cabeza en ninguno de los verracos de ninguno de los tres grupos en estudio después de la inoculación con el VSRRP. Cuando se estudió el porcentaje de espermatozoides con anomalías en la morfología de la cola los resultados dependieron del grupo en estudio. En los verracos del grupo A se estudiaron en conjunto los verracos 3, 4 y 6 y por separado el verraco número 2 y el verraco número 5 ya que no constituían un grupo homogéneo con los demás, lo cual impedía la aplicación de las pruebas

Resultados

estadísticas. En ninguno de los verracos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre el porcentaje de espermatozoides con anomalías en la morfología de la cola antes y después de la inoculación experimental. Cuando se estudian de forma aislada los valores obtenidos para cada uno de los verracos de este grupo, sólo en el caso del verraco 2 se observó un aumento del 9,1% después de la inoculación con el VSRRP, siendo este aumento más marcado entre los días 21 y 42 p.i.. El resto de los animales permanecieron con valores similares a los obtenidos antes de la inoculación experimental (2,5% más alto el verraco 3; 0,25 más bajo el verraco 4; 3,4% más bajo el verraco 5 y 1,9% más bajo el verraco 6).

En el grupo B el estudio estadístico del porcentaje de espermatozoides con anomalías en la morfología de la cola se llevó a cabo en conjunto para los verracos 7, 8 y 9, excluyéndose el verraco 10 por no constituir un grupo homogéneo con los demás y no permitir las comparaciones estadísticas. En este grupo se observó un aumento estadísticamente significativo ($p=0,05$), aunque no muy marcado, en el porcentaje de espermatozoides con colas anormales, siendo el aumento medio del 3,5%. Cuando se estudiaron cada uno de los animales por separado se pudo observar que 3 de los 4 animales de este grupo (verracos 7, 8 y 10) habían sufrido un aumento en este porcentaje (6,8%; 3,3% y 4,5% respectivamente), mientras que el verraco 9 se había mantenido en valores similares a los obtenidos antes de la inoculación con el VSRRP (con un aumento del 0,6%). El aumento en las colas anormales en este grupo fue más marcado entre los días 21 y 35 p.i..

En el grupo C no se apreciaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos para este parámetro antes y después de la inoculación experimental. Cuando se estudiaron los animales por separado no se observaron diferencias importantes entre los valores obtenidos antes y después del día 0, aumentando ligeramente en el verraco 11 (0,5%) y disminuyendo ligeramente en el verraco 12 (0,85%).

Los análisis estadísticos del porcentaje de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales se realizaron conjuntamente en los verracos 2, 3, 4 y 6 del grupo A y de forma separada en el verraco 5, ya que los valores obtenidos en este verraco no constituían un grupo homogéneo con los demás. En ninguno de los casos se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos antes de la inoculación con el VSRRP y después de la misma. Cuando se tuvieron en cuenta los valores individuales se observó que sólo el verraco 5 presentó un aumento apreciable en el número de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales (7,6%), mientras que los demás animales mostraron valores similares antes y después de la inoculación con el VSRRP. En el caso del porcentaje de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales, el estudio estadístico se realizó conjuntamente para los verracos 2, 3, 4 y 6 y por separado para el verraco 5, al no ser de nuevo homogéneos sus valores con los de los demás verracos de este grupo. En este caso el verraco 5 no mostró diferencias significativas, pero sí el resto de los verracos ($p<0,05$), con un aumento medio del 7,1%. Cuando se estudian los

Resultados

resultados de forma individual se observa que 3 de los 4 verracos (verracos 2, 3 y 6) presentaron aumentos del 5,5%, 13,5% y 14,0% respectivamente, mientras que el verraco restante (verraco 4) mostró una disminución del 4,6%. En cuanto al verraco 5, se mantuvo en valores similares a los que tenía antes de la inoculación, presentando un aumento del 0,6%.

Los análisis estadísticos del porcentaje de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales en el grupo B no revelaron ningún cambio después de la inoculación con el VSRRP. Considerando los animales de forma aislada se observa sin embargo un aumento del 6,3% en el verraco 7 y del 6,5% en el verraco 10, mientras que los verracos 8 y 9 mostraron aumentos del 1% y del 0,3% respectivamente, por lo que se puede considerar que no sufrieron cambios. Sin embargo, sí se produjo un aumento estadísticamente significativo en el número de gotas citoplasmáticas distales ($P < 0,01$), aumentando un 5,7% el número medio de espermatozoides con esta alteración. Cuando se analizaron los animales de forma individual se pudo observar que sólo 3 de los 4 verracos pertenecientes a este grupo (verracos 7, 9 y 10) mostraron aumentos que fueron del 5,9%; el 9% y el 3,4% respectivamente, mientras que el verraco 8 mostró una disminución del 3,4% en el porcentaje de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales.

En el grupo C no se produjeron cambios estadísticamente significativos en el porcentaje de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales ni con gotas citoplasmáticas distales, manteniéndose ambos animales en valores similares durante todo el experimento.

Para realizar el estudio estadístico del porcentaje de espermatozoides con morfología normal en el grupo A fue necesario reagrupar a los animales en 3 grupos, debido a la falta de homogeneidad entre ellos. Por un lado se analizaron los valores correspondientes a los verracos 2 y 6, por otro los correspondientes a los verracos 3 y 4 y finalmente los correspondientes al verraco 5 se tuvieron que analizar de forma individual. En los dos primeros grupos se produjeron diferencias estadísticamente significativas ($p < 0,05$), mientras que en el verraco 5 no existieron tales diferencias. La disminución media en el número de espermatozoides con una morfología normal fue del 9,8%. Cuando se estudiaron los datos correspondientes a cada animal por separado se observaron disminuciones del 15,9%; el 16,8%; el 5,1% y el 13,5% para los verracos 2, 3, 5 y 6 respectivamente, mientras que el verraco 4 mostró un aumento del 1,8% en el número de espermatozoides con morfología normal después de la inoculación con el VSRRP. La mayor disminución se observó entre los días 35 y 49 p.i..

El bajo número de espermatozoides con morfología normal en el grupo A (tabla 15) se debe fundamentalmente al efecto que sobre los valores medios ejerce el verraco 2, con valores muy bajos tanto antes como después de la inoculación con el VSRRP, y, en menor medida, el verraco 5 como se puede observar en la figura 13.

El análisis estadístico del porcentaje de espermatozoides con morfología normal en el grupo

Resultados

B se llevó a cabo conjuntamente para los verraco 7, 8 y 9 y por separado para el verraco 10, debido a la diferencia existente entre los valores normales de este animal y los de los demás. En el primer grupo se observaron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos antes y después de la inoculación con el VSRRP ($p < 0,01$), con una disminución media del 12,1%, mientras que el verraco 10 no mostró diferencias estadísticamente significativas. Cuando se analizaron de forma individual los datos correspondientes a cada uno de los animales se encontraron disminuciones en el porcentaje de espermatozoides con morfología normal en todos ellos. Esta disminución fue del 19,3% para el verraco 7, del 7,3% para el verraco 8, del 9,9% para el verraco 9 y del 7,5% para el verraco 10. La alteración fue más marcada entre los días 21 y 42 p.i..

En el grupo C no existieron diferencias estadísticamente significativas entre los valores obtenidos antes y después de la inoculación experimental.

En los verracos del grupo A, los análisis estadísticos del porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal y de la prueba de la ORT indicaron una disminución significativa estadísticamente en ambos parámetros ($p < 0,01$ en ambos casos) con valores del 10,8% en el caso del porcentaje de acrosomas normales y del 9,5% en el caso de los valores obtenidos en la prueba de la ORT. Cuando se analizaron de forma individual los datos de cada uno de los verracos se observaron disminuciones en todos los animales para ambos parámetros. Estas disminuciones fueron más acusadas entre los días 14 y 42 p.i., volviendo posteriormente ambos parámetros a los valores normales y permaneciendo así hasta el final del experimento.

El análisis de estos mismos parámetros en el grupo B mostró también una disminución estadísticamente significativa para ambos ($p < 0,01$ en ambos casos) con valores del 8,1% en el casos del porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal y del 7,2% en el caso de los valores de la prueba de ORT. Esta disminución se produjo entre los días 21 y 42 p.i. en el caso del porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal y entre los días 28 y 35 p.i. en el caso de la prueba de la ORT. Ambos parámetros volvieron a los valores normales a partir del día 49 p.i.. El análisis de los valores obtenidos en cada uno de los animales de forma aislada revela una disminución en todos los casos.

En el grupo C no se observaron diferencias estadísticamente significativas ni en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal ni en los valores obtenidos para la prueba de la ORT. Estudiando cada animal de forma individual observamos una disminución del 2,9% en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal y del 3,9% en la prueba de la ORT en el verraco 12. Los valores medios del porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales en las muestras de semen recogidas de los verracos de los grupos A, B y C antes y después de la inoculación con el VSRRP se muestran en la figura 14.

Resultados

Tabla 4: Valoración de la calidad del semen del verraco número 2, perteneciente al grupo A, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	86	54	32	646,6	90	0	37	2	2	59	80	64,5
-42	95	57	38	787,6	90	0	29	0	6	65	93	73,5
-35	88	64	24	856,0	90	0	27	2	6	65	92	82,0
-28	87	37	50	587,0	90	1	35	2	4	58	86	77,5
-21	127	47	80	644,5	95	0	12	2	3	83	82	61,5
-14	43	25	18	437,5	90	0	15	3	10	72	89	77,5
-7	107	46	61	676,5	90	0	18	1	7	74	83	62,5
0	61	25	36	392,0	95	0	11	2	7	80	82	65,5
3	120	48	72	537,2	80	0	21	1	11	67	77	74,0
7	119	59	60	769,0	60	0	14	0	6	80	85	70,5
14	135	63	72	577,3	60	0	27	3	4	66	69	61,0
21	133	53	80	589,0	60	1	41	1	7	50	68	60,5
28	144	74	70	728,7	40	0	34	1	10	55	73	52,5
35	123	61	62	884,6	60	1	47	2	14	36	57	46,0
42	107	63	44	1075,3	65	1	52	2	32	13	67	53,0
49	115	67	48	774,2	85	0	21	2	15	62	85	66,0
56	99	41	58	624,1	90	0	32	3	6	59	89	74,5
63	81	41	40	521,6	85	0	20	2	2	76	80	70,0
70	129	47	82	622,3	85	1	46	0	6	47	84	76,0

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Tabla 5: Valoración de la calidad del semen del verraco número 3, perteneciente al grupo A, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	114	49	65	264,2	80	0	3	0	0	97	72	62,0
-42	65	4	61	72,7	90	0	0	1	1	95	75	63,0
-35	150	40	110	163,6	80	0	1	0	4	95	80	67,0
-28	120	36	84	278,5	85	0	1	3	0	96	75	59,0
-21	139	19	120	152,0	95	0	1	2	1	96	82	65,0
-14	100	40	60	267,0	85	0	1	0	2	97	92	62,0
-7	157	49	108	295,1	95	0	1	0	1	98	70	58,5
0	94	20	74	225,1	85	0	1	7	3	89	73	66,0
3	68	30	38	432,9	85	0	0	0	0	100	85	61,0
7	102	40	62	663,7	85	0	0	1	11	88	72	69,5
14	97	37	60	487,6	80	0	0	0	5	95	74	65,5
21	137	82	55	674,9	70	0	7	3	5	85	63	49,5
28	189	37	152	193,7	80	0	1	4	9	86	65	43,0
35	127	43	84	385,6	80	0	2	5	30	63	62	41,5
42	111	47	64	263,8	85	0	15	3	27	55	77	60,5
49	168	32	136	121,4	80	0	4	3	33	60	82	49,5
56	179	87	92	507,6	90	0	4	1	8	87	80	74,5
63	182	30	152	237,1	85	0	2	2	2	94	78	66,0
70	258	73	185	307,1	90	0	2	2	2	94	78	72,0

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Resultados

Tabla 6: Valoración de la calidad del semen del verraco número 4, perteneciente al grupo A, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	87	32	55	377,6	80	0	0	0	10	90	84	61,5
-42	105	78	27	584,6	80	0	0	2	6	92	83	69,0
-35	37	12	25	288,0	85	0	5	1	53	41	95	81,5
-28	56	18	38	306,1	85	0	1	3	4	92	91	82,0
-21	155	61	94	401,6	95	0	0	1	9	90	89	75,5
-14	136	50	86	276,7	85	0	0	1	17	82	90	72,5
-7	64	33	31	530,7	90	0	0	0	1	99	83	64,5
0	63	19	44	138,7	90	0	2	10	3	85	77	76,0
3	111	53	58	523,8	80	0	1	19	5	75	81	65,5
7	144	51	93	507,0	85	0	0	7	5	88	81	67,0
14	117	50	67	353,4	75	0	1	5	4	90	76	69,5
21	103	28	75	201,2	65	0	3	2	19	76	71	55,0
28	123	58	65	558,7	65	0	1	2	4	93	70	50,5
35	118	48	70	529,2	80	0	0	4	10	86	65	57,5
42	159	61	98	423,0	75	0	0	3	13	84	76	56,0
49	149	59	90	787,7	90	0	0	1	6	93	81	70,5
56	161	41	120	250,8	95	1	0	4	2	93	90	77,0
63	105	45	60	610,0	90	0	0	2	5	93	78	70,0
70	176	53	123	372,8	90	0	0	0	3	97	83	66,0

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Tabla 7: Valoración de la calidad del semen del verraco número 5, perteneciente al grupo A, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	103	76	27	517,7	95	0	38	26	18	18	68	39,0
-42	98	16	82	175,4	80	0	28	30	30	12	86	67,0
-35	106	60	46	628,2	90	0	36	36	12	16	88	72,0
-28	118	46	72	244,7	95	0	19	40	22	19	79	72,5
-21	170	49	121	214,4	90	1	36	19	14	30	85	70,0
-14	92	31	61	233,0	95	0	40	29	21	10	94	79,5
-7	132	46	86	375,8	85	0	20	36	26	18	82	65,0
0	130	40	90	292,5	90	0	33	12	12	43	77	65,6
3	119	49	70	407,1	75	0	39	29	18	14	77	59,5
7	155	58	97	340,7	80	2	24	43	24	7	73	59,5
14	85	33	52	387,3	40	0	28	25	47	0	81	56,5
21	93	48	45	366,0	60	0	19	42	15	24	70	57,0
28	136	46	90	301,3	65	0	23	36	15	26	57	39,5
35	123	33	90	167,6	70	1	32	34	25	8	50	49,5
42	123	58	65	390,0	70	0	36	49	15	0	72	52,0
49	167	53	114	317,2	85	0	22	31	1	46	82	72,5
56	145	37	108	186,2	90	0	14	53	17	16	86	76,5
63	131	45	86	202,7	75	0	20	27	46	7	88	68,0
70	137	49	88	258,0	80	0	26	43	12	19	75	60,0

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Resultados

Tabla 8: Valoración de la calidad del semen del verraco número 6, perteneciente al grupo A, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	62	21	41	335,9	80	0	6	11	35	48	76	46,5
-42	119	49	70	237,1	85	0	9	3	11	77	88	76,0
-35	182	80	102	235,5	90	0	5	2	8	85	90	73,0
-28	206	100	106	330,2	95	0	2	2	7	89	85	71,5
-21	103	25	78	102,2	90	0	0	8	17	75	81	64,0
-14	216	72	144	187,3	90	0	2	10	8	80	94	79,5
-7	158	43	115	345,9	90	0	2	3	7	88	84	72,5
0	171	57	114	275,3	85	0	30	26	18	26	78	62,0
3	131	43	88	265,1	70	0	5	9	3	83	77	69,0
7	196	56	140	280,0	85	0	7	5	8	80	77	65,5
14	105	39	66	192,1	80	0	3	2	52	43	79	66,5
21	109	54	55	341,6	70	0	1	11	26	62	65	56,0
28	212	99	113	357,0	70	0	4	21	28	47	66	46,5
35	102	40	62	427,5	70	0	9	13	31	47	61	57,0
42	212	52	160	229,6	70	0	9	9	64	18	67	45,5
49	183	59	124	259,4	80	0	3	6	11	80	87	74,0
56	267	85	182	214,4	90	0	2	10	9	79	90	79,0
63	158	45	113	249,4	85	0	3	5	15	77	84	68,5
70	208	66	142	301,0	90	0	0	1	17	82	84	65,0

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Tabla 9: Valoración de la calidad del semen del verraco número 7, perteneciente al grupo B, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	70	50	20	1113,1	95	0	0	0	0	100	78	67,0
-42	80	39	41	442,3	95	0	1	0	10	89	91	76,0
-35	96	33	63	262,2	95	0	0	0	3	97	77	66,5
-28	169	92	77	305,0	95	0	0	1	1	98	82	82,5
-21	133	30	103	416,2	95	0	0	0	1	99	83	68,0
-14	162	62	100	136,5	90	0	1	1	0	98	87	81,0
-7	89	52	37	751,3	95	0	0	0	0	100	79	62,5
0	122	29	93	139,2	95	0	0	0	3	97	82	59,0
3	136	38	98	306,9	90	0	1	1	1	97	81	66,0
7	156	36	120	551,5	80	0	2	1	24	73	79	60,5
14	223	41	182	180,9	80	0	0	0	2	98	72	65,0
21	128	33	95	378,1	70	2	33	3	11	51	70	58,5
28	136	61	75	508,8	75	1	0	25	2	72	65	54,0
35	95	27	68	215,6	80	0	12	11	18	59	69	56,5
42	168	41	127	346,9	85	0	8	10	7	75	72	63,0
49	175	39	136	147,1	90	0	0	1	0	99	86	71,0
56	152	45	107	297,4	80	1	3	2	1	93	79	66,0
63	201	53	148	303,1	85	1	0	1	4	94	84	69,0
70	140	45	95	740,0	95	0	0	1	5	94	76	67,5

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Resultados

Tabla 10: Valoración de la calidad del semen del verraco número 8, perteneciente al grupo B, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	16	6	10	180,6	80	2	2	0	6	90	78	62,5
-42	48	26	22	780,0	90	1	1	1	4	93	88	78,0
-35	64	42	22	660,3	80	0	1	2	4	93	82	68,5
-28	45	20	25	346,1	80	1	1	4	0	94	89	78,5
-21	82	42	40	393,4	80	1	1	0	1	97	86	78,0
-14	44	21	23	497,9	85	0	2	1	1	96	90	69,5
-7	86	39	47	431,2	90	0	2	0	6	92	83	69,5
0	46	22	24	247,8	90	0	0	1	2	97	86	68,0
3	33	10	23	512,6	80	0	0	1	0	99	83	70,0
7	88	33	55	383,8	85	0	1	1	4	94	90	76,0
14	60	36	24	877,2	80	0	1	2	3	94	79	73,0
21	89	35	54	417,9	70	0	5	4	14	77	70	61,0
28	68	31	37	586,2	70	0	5	6	7	82	63	52,5
35	55	30	25	746,8	85	0	6	0	14	80	64	52,0
42	94	33	61	784,2	90	1	13	1	5	80	76	61,0
49	71	33	38	515,0	85	1	5	2	4	88	87	75,5
56	111	51	60	560,0	90	1	0	3	3	93	84	74,5
63	86	28	58	307,4	85	0	0	2	5	93	78	67,0
70	113	53	60	424,4	90	0	1	0	4	95	80	67,0

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Tabla 11: Valoración de la calidad del semen del verraco número 9, perteneciente al grupo B, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	84	39	45	550,4	95	0	1	1	0	98	90	71,0
-42	62	46	16	657,1	95	0	0	3	0	97	90	80,0
-35	153	73	80	368,3	95	0	0	0	0	100	79	63,5
-28	165	60	105	297,4	90	0	0	0	0	100	88	82,0
-21	127	28	99	254,7	95	0	0	1	3	96	91	69,0
-14	175	37	138	159,0	85	0	1	1	1	97	88	68,0
-7	196	55	141	413,6	90	0	0	0	0	100	88	71,5
0	147	27	120	219,0	95	0	1	1	2	96	74	66,0
3	113	40	73	418,1	90	0	1	0	1	98	86	72,5
7	173	65	108	312,3	80	0	0	1	6	93	78	70,0
14	169	41	128	275,6	80	0	0	1	16	83	83	69,5
21	223	43	180	301,7	70	0	1	1	1	97	79	61,0
28	238	96	142	311,9	75	0	0	4	5	91	73	63,0
35	185	57	128	489,0	85	0	3	1	7	89	74	54,5
42	211	61	150	342,8	90	0	1	0	39	60	73	50,5
49	229	69	160	368,3	90	0	2	1	3	94	77	67,0
56	109	55	54	548,7	90	0	1	4	6	89	83	75,0
63	105	20	85	487,9	85	0	0	1	4	95	88	69,5
70	221	51	170	367,7	95	0	3	1	18	78	85	76,0

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Resultados

Tabla 12: Valoración de la calidad del semen del verraco número 10, perteneciente al grupo B, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	121	38	83	217,7	95	0	10	1	5	84	77	55,0
-42	108	38	70	425,2	90	0	2	0	2	96	80	47,0
-35	118	42	76	328,6	90	0	4	2	6	88	73	69,5
-28	115	40	75	338,5	90	0	3	2	0	95	86	82,0
-21	129	50	79	225,7	80	0	6	0	1	93	86	72,0
-14	113	20	93	159,1	95	0	2	13	7	78	78	65,0
-7	141	48	93	325,4	80	0	0	1	1	98	93	67,5
0	110	43	67	286,2	90	0	8	0	0	92	78	56,5
3	65	23	42	229,4	90	0	2	1	0	97	78	67,0
7	77	54	23	449,8	90	0	0	0	3	97	78	63,5
14	77	27	50	338,9	70	0	14	1	4	81	79	70,0
21	117	45	72	313,5	75	0	4	3	5	88	67	55,5
28	91	48	43	284,2	80	0	9	3	13	75	62	45,0
35	161	65	96	306,0	80	0	33	6	18	43	63	46,5
42	173	55	118	179,7	90	0	8	0	4	88	78	60,5
49	189	47	142	174,1	90	0	1	2	2	95	84	60,0
56	175	25	150	132,6	90	0	0	2	2	96	85	78,0
63	98	28	70	240,7	90	0	3	1	2	94	82	70,0
70	211	41	170	233,6	95	0	4	3	2	91	76	72,0

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Tabla 13: Valoración de la calidad del semen del verraco número 11, perteneciente al grupo C, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	125	36	89	293,7	85	2	1	0	0	99	70	57,0
-42	110	41	69	429,5	80	0	0	2	0	100	72	64,0
-35	98	45	53	317,0	80	0	0	0	1	99	73	69,5
-28	120	47	73	491,3	80	0	1	1	2	96	80	70,0
-21	126	42	84	389,5	80	0	1	0	0	99	79	66,5
-14	115	40	75	359,8	85	0	0	1	4	95	85	69,5
-7	130	45	85	365,4	85	0	1	4	6	89	84	70,5
0	90	34	56	401,8	80	0	0	1	7	92	76	74,0
7	110	39	71	339,6	80	0	0	1	0	99	78	67,5
14	138	53	85	366,8	80	0	0	1	4	95	81	65,5
21	116	53	63	451,6	80	0	1	2	1	96	75	66,0
28	134	54	80	290,1	80	0	1	1	2	96	79	69,5
35	106	41	65	358,5	80	0	1	0	0	99	78	63,0
42	125	47	78	352,1	85	1	4	1	1	93	75	74,5
49	106	45	61	338,6	85	0	0	2	3	95	77	72,0
56	140	50	90	423,7	80	0	4	3	0	91	80	74,0

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Resultados

Tabla 14: Valoración de la calidad del semen del verraco número 12, perteneciente al grupo C, antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	140	40	100	342,6	95	2	0	2	4	90	84	63,0
-42	130	42	88	365,1	80	0	0	2	0	96	72	61,0
-35	113	37	76	206,2	80	0	1	2	1	96	76	68,0
-28	96	32	64	316,3	80	1	5	5	2	87	81	70,5
-21	112	45	67	468,5	80	1	5	3	2	89	81	67,0
-14	124	43	81	257,5	80	0	6	0	3	91	75	70,0
-7	106	36	70	297,0	85	0	8	3	1	88	79	71,0
0	108	39	69	328,5	80	0	4	2	1	93	71	51,0
7	109	45	64	423,0	80	0	3	2	1	94	63	40,5
14	140	48	92	348,8	85	0	2	1	1	96	68	54,0
21	136	47	89	321,1	80	0	2	1	0	97	73	63,0
28	128	51	77	417,3	90	2	0	2	1	95	82	69,0
35	135	43	92	279,0	90	1	4	1	1	93	76	65,5
42	102	37	65	314,9	90	0	1	1	2	96	77	68,0
49	98	40	58	383,8	90	0	6	2	4	88	82	69,0
56	144	45	99	243,5	80	0	2	2	2	96	78	68,0

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ /mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Tabla 15: Valores medios de calidad espermática de los verracos pertenecientes al grupo A antes y después de la inoculación con el VSRRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	90,4	46,4	44,0	428,3	85,0	0,0	16,8	7,8	13,0	62,4	76,0	54,7
-42	96,4	40,8	55,6	371,4	85,0	0,0	13,2	7,2	10,8	68,8	85,0	69,7
-35	112,6	51,2	61,4	434,2	87,0	0,0	14,8	8,2	16,6	60,4	89,0	73,9
-28	117,4	47,4	70,0	324,0	90,0	0,2	11,6	10,0	7,4	70,8	83,2	72,5
-21	138,8	40,2	98,6	302,9	93,0	0,2	9,8	6,4	8,8	74,8	83,8	67,2
-14	117,4	43,6	73,8	280,3	89,0	0,0	11,6	8,6	11,6	68,2	91,8	74,2
-7	123,6	43,4	80,2	444,8	90,0	0,0	8,2	8,0	8,4	75,4	80,4	64,6
0	103,8	32,2	71,6	264,7	89,0	0,0	15,4	11,4	8,6	64,6	77,4	67,0
3	109,8	44,6	65,2	433,2	78,0	0,0	13,2	11,6	7,4	67,8	79,4	65,8
7	143,2	52,8	90,4	512,0	79,0	0,4	9,0	11,2	9,6	69,8	77,6	66,4
14	107,8	44,4	63,4	399,5	67,0	0,0	11,8	7,0	22,4	58,8	75,8	63,8
21	115,0	53,0	62,0	434,5	65,0	0,2	14,2	11,8	14,4	59,4	67,4	55,6
28	160,8	62,8	98,0	427,8	64,0	0,0	12,6	12,8	13,2	61,4	66,2	46,4
35	118,6	45,0	73,6	478,9	72,0	0,4	18,0	11,6	22,0	48,0	59,0	50,3
42	142,4	56,2	86,2	476,3	73,0	0,2	22,4	13,2	30,2	34,0	71,8	53,4
49	156,4	54,0	102,4	451,9	84,0	0,0	10,0	8,6	13,2	68,2	83,4	66,5
56	170,2	58,2	112,0	356,6	91,0	0,2	10,4	14,2	8,4	66,8	87,0	76,3
63	131,4	41,2	90,2	364,1	84,0	0,0	9,0	7,6	14,0	69,4	81,6	68,5
70	181,6	57,6	124,0	372,2	87,0	0,2	14,8	9,2	8,0	67,8	80,8	67,8

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ /mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Resultados

Tabla 16: Valores medios de calidad espermática de los verracos pertenecientes al grupo B antes y después de la inoculación con el VSRP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	72,7	33,2	39,5	515,4	91,2	0,5	3,3	0,5	2,7	93,0	80,7	63,9
-42	74,5	37,2	37,3	576,1	92,5	0,3	1,0	1,0	4,0	93,7	87,2	70,2
-35	107,7	47,5	60,2	404,8	90,0	0,0	1,2	1,0	3,3	94,5	77,7	67,0
-28	123,5	53,0	70,5	321,7	88,7	0,3	1,0	1,7	0,3	96,7	86,2	81,2
-21	117,7	37,5	80,2	322,5	87,5	0,3	1,7	0,3	1,5	96,2	86,5	71,7
-14	123,5	35,0	88,5	238,1	88,7	0,0	1,5	4,0	2,3	92,2	85,7	70,9
-7	128,0	48,5	79,5	480,4	88,7	0,0	0,5	0,3	1,7	97,5	85,7	67,7
0	106,2	30,2	76,0	223,0	92,5	0,0	2,2	0,5	1,8	95,5	80,0	62,4
3	70,3	24,3	46,0	386,7	86,7	0,0	1,0	0,7	0,3	98,0	82,0	69,8
7	123,5	47,0	76,5	424,3	83,7	0,0	0,8	0,7	9,3	89,2	81,2	67,5
14	132,2	36,2	96,0	418,1	77,5	0,0	3,8	1,0	6,2	89,0	78,2	69,4
21	139,2	39,0	100,2	352,8	71,2	0,5	10,8	2,7	7,7	78,3	71,5	59,0
28	133,2	59,0	74,2	422,8	75,0	0,3	3,5	9,5	6,7	80,0	65,7	53,6
35	124,0	44,7	79,3	439,3	82,5	0,0	13,5	4,5	14,3	67,7	67,5	52,4
42	161,5	47,5	114,0	435,6	90,0	0,3	7,5	2,7	13,8	75,7	75,7	57,3
49	166,0	47,0	119,0	301,1	88,7	0,3	2,0	1,5	2,2	94,0	83,5	68,4
56	131,7	43,7	88,0	413,8	90,0	0,3	0,3	3,0	3,7	92,7	84,0	75,8
63	122,5	32,2	90,3	334,8	86,2	0,3	0,7	1,2	3,8	94,0	83,0	68,9
70	171,2	47,5	123,7	441,4	93,7	0,0	2,0	1,2	7,3	89,5	79,2	70,6

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ /mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

Tabla 17: Valores medios de calidad espermática de los verracos pertenecientes al grupo C antes y después de la inoculación con un sobrenadante de un cultivo de MAP.

Día	V.T.	V.F.R.	V.F.P.	Conc.	Motilid.	C.A.	Co.A.	G.C.P.	G.C.D.	E.N.	A.N.	O.R.T.
-49	132,5	38,0	94,5	318,1	90,0	2,0	0,5	1,0	2,0	94,5	77,0	60,0
-42	120,0	41,5	78,5	397,3	80,0	0,0	0,0	2,0	0,0	98,0	72,0	62,5
-35	105,5	41,0	64,5	261,6	80,0	0,0	0,5	1,0	1,0	97,5	74,5	68,8
-28	108,0	39,5	68,5	403,8	80,0	0,5	3,0	3,0	2,0	91,5	80,5	70,3
-21	119,0	43,5	75,5	429,0	80,0	0,5	3,0	1,5	1,0	94,0	80,0	66,8
-14	119,5	41,5	78,0	308,6	82,5	0,0	3,0	0,5	3,5	93,0	80,0	69,8
-7	118,0	40,5	77,5	331,2	85,0	0,0	4,5	3,5	3,5	88,5	81,5	70,8
0	99,0	36,5	62,5	365,1	80,0	0,0	2,0	1,5	4,0	92,5	73,5	62,5
7	109,5	42,0	67,5	381,3	80,0	0,0	1,5	1,5	0,5	96,5	70,5	54,0
14	139,0	50,5	88,5	357,8	82,5	0,0	1,0	1,0	2,5	95,5	74,5	59,8
21	126,0	50,0	76,0	386,3	80,0	0,0	1,5	1,5	0,5	96,5	74,0	64,5
28	131,0	52,5	78,5	353,7	85,0	1,0	0,5	1,5	1,5	95,5	80,5	69,3
35	120,5	42,0	78,5	318,7	85,0	0,5	2,5	0,5	0,5	96,0	77,0	64,3
42	113,5	42,0	71,5	333,5	87,5	0,5	2,5	1,0	1,5	94,5	76,0	71,3
49	102,0	42,5	59,5	361,2	87,5	0,0	3,0	2,0	3,5	91,5	79,5	70,5
56	142,0	47,5	94,5	333,6	80,0	0,0	3,0	2,5	1,0	93,5	79,0	71,0

V.T.: Volumen total del eyaculado en mL; V.F.R.: Volumen de la fracción rica en mL; V.F.P.: Volumen de la fracción pobre en mL; Conc.: Concentración total de espermatozoides ($\times 10^6$ /mL); Motilid.: % de espermatozoides móviles; C.A.: % de espermatozoides con cabezas anormales; Co.A.: % de espermatozoides con colas anormales; G.C.P.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas proximales; G.C.D.: % de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales; E.N.: % de espermatozoides con morfología normal; A.N.: % de espermatozoides con acrosoma normal; O.R.T.: Prueba de resistencia osmótica (expresada en %).

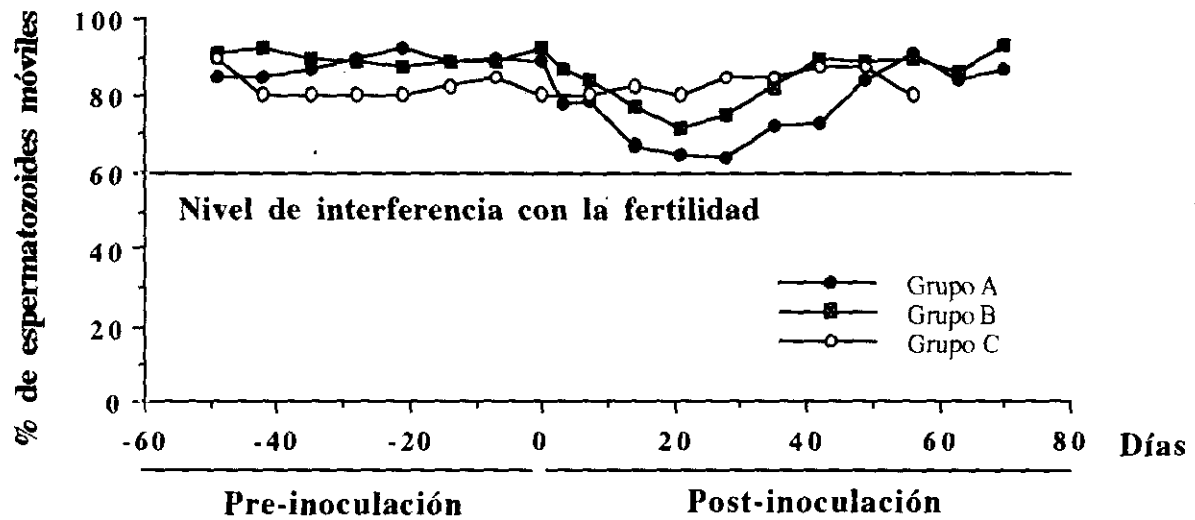


Figura 12: Porcentaje medio de espermatozoides móviles en las muestras recogidas de los grupos A, B y C antes y después de la inoculación con el VSRRP. El nivel en el cual la calidad del semen se ve comprometida, ya que puede interferir con la fertilidad, es el propuesto por Hurtgen *et al.*, (1980).

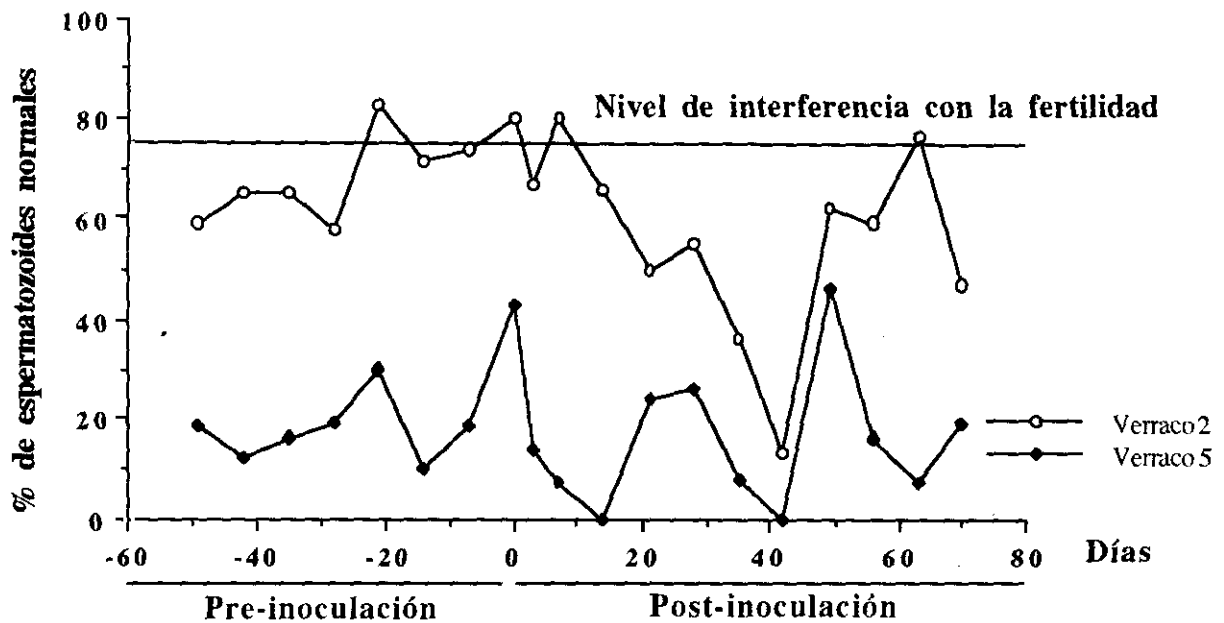


Figura 13: Porcentaje de espermatozoides normales de los verracos 2 y 5 pertenecientes al grupo A a lo largo del periodo de estudio.

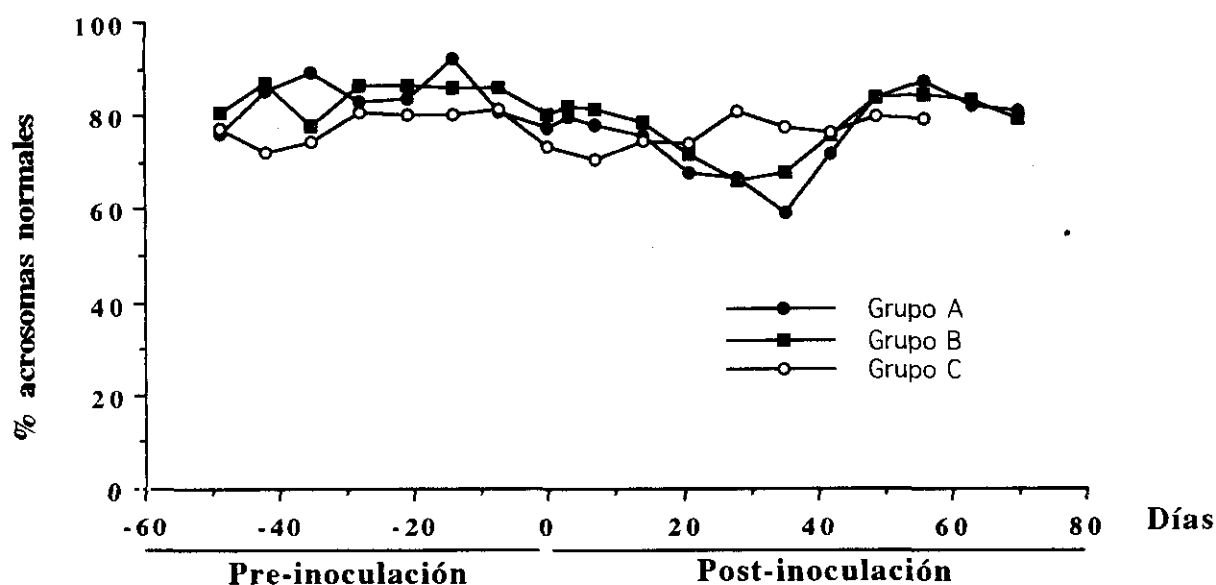


Figura 14: Porcentaje medio de espermatozoides con acrosoma normal en las muestras de semen recogidas de los verracos de los grupos A, B y C antes y después de la inoculación con el VSRRP.

4.1.3. Serología

Las cuatro primeras muestras de sangre extraídas a cada uno de los 11 animales en estudio (en los días -3, 3, 6 y 9) fueron negativas a la presencia de anticuerpos frente al VSRRP mediante la técnica de IPMA, mientras que las muestras de sangre correspondientes a los días 15, 25 y 72 p.i. fueron positivas, con un título $>1:100$ por esta misma técnica, para los verracos de los grupos A y B, permaneciendo los verracos del grupo C negativos durante todo el estudio.

4.1.4. Detección del virus

La tabla 18 muestra los resultados de aislamiento del VSRRP para las muestras de suero obtenidas de todos los verracos a lo largo del estudio. Como se aprecia en esta tabla, todas las muestras de suero obtenidas antes de la inoculación con el VSRRP fueron negativas al aislamiento vírico, mientras que después de la inoculación fue posible el aislamiento del virus, aunque con DI_{50CT} bajas, en muestras de suero de todos los verracos de los grupos A y B en los días 3, 9 y 15, con la excepción del verraco 5 del grupo A y del verraco 7 del grupo B que fueron negativos en el día 15. Todas las muestras de suero obtenidas de los verracos pertenecientes al grupo C fueron negativas.

Resultados

Todos los hisopos nasales, fecales y prepuciales obtenidos a lo largo del estudio de todos los verracos de los grupos A, B y C fueron negativos.

En cuanto a las muestras de semen, el VSRRP sólo pudo ser aislado de la muestra obtenida del verraco 7 (grupo B) en el día 7 p.i.. El título vírico en esta muestra fue de 7×10^2 DI₅₀CT/mL. Los resultados del bioensayo llevado a cabo con lechones confirmó la presencia del VSRRP en esta muestra de semen y reveló su presencia en la muestra obtenida del verraco 3 (grupo A) en el día 7 p.i.. Los lechones inoculados con ambas muestras seroconvirtieron, presentando un título de 1:960 y 1:3840, respectivamente, por la técnica de IPMA. El lechón utilizado como testigo positivo también seroconvirtió, presentando un título de 1:1920. Todas las muestras de semen en las que se realizó la prueba de RT-PCR fueron negativas.

Las muestras de virus inoculadas en los cultivos de MAP para determinar la sensibilidad de los lotes empleados fueron todas positivas cuando se añadieron 2×10^3 DI₅₀CT y 2×10^2 DI₅₀CT, pero solamente en algunos casos cuando se añadieron 2×10^1 DI₅₀CT.

Tabla 18: Resultados del aislamiento vírico en cultivos de MAP partir de las muestras de suero obtenidas de los verracos de los grupos A, B y C antes y después de la inoculación con el VSRRP y titulación de las positivas.

Días	Verracos del Grupo A					Verracos del Grupo B				Verracos del Grupo C	
	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
-3	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+3	+(2,9)	+(2,6)	+(<2)	+(<2)	+(<2)	+(<2)	+(<2)	+(<2)	+(<2)	-	-
+9	+(2,6)	+(2,3)	+(<2)	+(<2)	+(<2)	+(<2)	+(<2)	+(<2)	+(2,9)	-	-
+15	+(<2)	+(<2)	+(<2)	-	+(<2)	+(<2)	+(3,08)	-	+(3,08)	-	-
+25	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
+72	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

+: muestra positiva en cultivo de MAP

-: muestra negativa en cultivo de MAP

Los títulos víricos están calculados como DI₅₀CT/mL y están expresados en la forma de log X, siendo X el número que aparece entre paréntesis.

4.2. Estudio de la infección por el VSRRP en los verracos: sintomatología asociada a la misma, estudio de la distribución orgánica del virus y de su eliminación y determinación de la procedencia del virus que se elimina por la vía genital (objetivos A.1, A.4 y A.5)

4.2.1. Signos clínicos observados

Ninguno de los verracos en estudio mostró ningún síntoma de padecer un proceso respiratorio, permaneciendo normales durante todo el experimento. Tampoco se apreciaron signos de anorexia en la mayoría de los verracos, con la excepción del verraco 15, que no comió en el día 1 p.i. y del verraco 16 que estuvo inapetente desde el día 1 hasta el día 3 p.i.. Este último verraco mostró también signos de depresión durante estos mismos días.

En cuanto a las temperaturas rectales, éstas figuran en la tabla 19, pudiéndose apreciar que la mayoría de los animales tuvieron temperaturas que pueden ser consideradas febriles tras la inoculación con el VSRRP, fundamentalmente en los días 3 y 4 p.i., manteniendo temperaturas elevadas en días posteriores sólo algunos de los animales. Además, el verraco número 13 presentó una temperatura considerada febril en el día 2 p.i.. Las temperaturas rectales superaron en la mayoría de los animales los 40°C en alguno de los días estudiados, siendo la temperatura más alta alcanzada de 41,09°C, compartida por el verraco 6 en el día 3 p.i. y el verraco 15 en el día 5 p.i..

4.2.2. Serología

Los resultados obtenidos en las pruebas serológicas llevadas a cabo aparecen en la tabla 20. Todas las muestras de suero obtenidas antes de la inoculación experimental con el VSRRP fueron negativas a la presencia de anticuerpos frente al VSRRP mediante una técnica de ELISA, de la misma forma que las muestras obtenidas en el día 2 p.i. y la mayoría de las obtenidas hasta el día 9, momento en que los animales empezaron a seroconvertir, siendo todos positivos en el día 13 p.i. con títulos $\geq 1:400$. Destaca la aparición de un suero positivo en el día 3 p.i. (perteneciente al verraco 3), aunque con un título $< 1:200$ y otro el día 4 (verraco 16) con un título de 1:200.

Tabla 19: Temperaturas rectales de los verracos desde el día de la inoculación con el VSRRP hasta el día 22 p.i.en los verracos 19 y 20 hasta el momento del sacrificio en los demás.

Nº Verraco	Días post-inoculación																						
	D0	D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18	D19	D20	D21	D22
1	38,26	37,36	38,67	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
2	36,89	37,29	39,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
3	37,94	37,76	38,38	39,63	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
4	38,83	38,16	39,15	40,65	38,16	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
5	38,02	38,72	39,00	40,13	39,57	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
6	38,51	39,32	38,90	41,09	40,38	38,28	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	38,11	38,31	39,68	39,23	39,31	39,12	39,38	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	38,01	38,75	39,02	40,62	39,76	40,01	38,48	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	38,64	39,20	38,90	40,46	39,43	39,18	39,79	39,46	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
10	38,51	38,08	38,92	39,01	39,33	40,24	40,15	38,56	38,52	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
11	38,73	37,68	39,02	39,86	40,07	38,93	39,59	39,20	39,05	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
12	38,58	39,12	39,43	39,07	40,02	39,17	39,38	39,33	39,31	39,29	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
13	37,58	39,19	39,78	38,99	39,89	39,13	39,63	38,88	38,95	39,24	38,36	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
14	38,49	38,18	39,12	39,36	38,82	38,80	39,16	39,92	38,82	38,84	39,84	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
15	38,14	40,09	39,07	39,89	41,09	38,31	39,48	38,31	38,82	38,97	38,20	38,36	37,60	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	38,31	40,38	39,49	38,83	39,40	38,59	39,17	39,27	38,27	39,80	38,21	38,27	38,51	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	38,03	39,64	39,01	40,14	39,38	38,95	39,64	39,38	38,83	39,78	37,71	38,32	38,50	38,26	38,74	39,00	38,34	-	-	-	-	-	-
18	38,51	37,84	39,41	38,32	38,81	38,91	39,72	38,69	38,71	38,95	38,73	38,85	37,78	38,02	38,94	39,26	37,80	38,45	37,28	37,73	38,34	38,94	-
19	38,59	37,76	39,67	40,62	40,33	38,90	39,26	39,10	38,97	39,64	38,07	39,34	37,88	38,32	39,57	38,73	37,49	38,47	37,03	38,42	37,80	38,88	39,23
20	38,60	37,90	38,84	39,58	38,43	38,60	39,34	38,97	38,56	39,18	37,88	38,53	37,13	38,37	38,13	38,62	38,69	38,28	38,05	38,18	38,31	38,93	38,91

En el D0 las temperaturas rectales se tomaron antes de la inoculación con el VSRRP.

Tabla 20: Resultados del estudio de detección de anticuerpos frente al VSRRP por la técnica de ELISA y títulos de anticuerpos obtenidos por la misma técnica a lo largo del periodo de estudio.

Nº del verraco		Día de obtención de las muestras														
(Día de sacrificio)		D0	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D13	D17	D23	D30	D37
Verraco 1	(D2)	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 2	(D2)	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 3	(D3)	-	ND	+ (<1:200)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 4	(D4)	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 5	(D4)	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 6	(D5)	-	ND	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 7	(D6)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 8	(D6)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 9	(D7)	-	ND	ND	-	ND	-	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 10	(D8)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 11	(D8)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 12	(D9)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 13	(D10)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	+ (1:400)	+ (1:800)	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 14	(D10)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	-	+ (1:400)	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 15	(D13)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	+ (1:400)	ND	ND	ND	ND
Verraco 16	(D13)	-	ND	ND	+ (1:200)	ND	-	ND	ND	+ (1:800)	ND	+ (1:800)	ND	ND	ND	ND
Verraco 17	(D17)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	+ (1:400)	+ (1:400)	ND	ND	ND
Verraco 18	(D23)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	+ (1:400)	ND	+ (1:800)	+ (1:800)	+ (1:800)	ND	ND
Verraco 19	(D30)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	+ (1:400)	+ (1:800)	+ (1:800)	+ (1:800)	ND
Verraco 20	(D37)	-	ND	ND	-	ND	-	ND	ND	-	ND	+ (1:400)	+ (1:400)	+ (1:800)	+ (1:800)	+ (1:800)

ND: muestra no disponible.

4.2.3. Distribución del VSRRP en el aparato reproductor

Los resultados obtenidos en el aislamiento del VSRRP a partir de muestras procedentes del aparato reproductor en cultivos de MAP, así como los títulos víricos obtenidos en las muestras positivas, aparecen en la tabla 21. En ella se observa que el VSRRP se encontraba presente en la mayoría de los ganglios testiculares estudiados desde el día 2 hasta el día 17 p.i., coincidiendo en gran medida con su aparición en otras localizaciones del sistema linfático. Por el contrario, su presencia fue menos constante en los órganos del aparato reproductor. Entre estos últimos, hay que destacar al epidídimo, que, en todas las divisiones que se hicieron para su estudio, fue el órgano donde se aisló con mayor frecuencia, estando presente en las muestras procedentes de 8 de los verracos en estudio, aunque con títulos víricos que rara vez alcanzaron las 10^3 DI₅₀CT/g de tejido. Por el contrario, sólo fue posible aislar el VSRRP a partir de las muestras de testículo de uno de los verracos (verraco 8, sacrificado en el día 6 p.i.), con títulos próximos a 10^2 DI₅₀CT/g de tejido. En cuanto a las glándulas anejas, sólo fue posible aislar el VSRRP de 3 de las muestras procedentes de las glándulas bulbouretrales (pertenecientes a los verracos 8, 15 y 17, sacrificados en los días 6, 13 y 17 p.i. respectivamente), de 2 de las muestras procedentes de las vesículas seminales (pertenecientes a los verracos 7 y 17, sacrificados en los días 6 y 17 p.i. respectivamente) y de 5 de las muestras de próstata (pertenecientes a los verracos 5, 7, 12, 16 y 19, sacrificados en los días 4, 6, 9, 17 y 30 p.i. respectivamente).

Los resultados de la inoculación experimental a lechones de 4 semanas de vida con el semen extraído de ambos epidídimos de cada uno de los verracos en estudio no reveló la presencia del VSRRP en ninguna de las muestras, ya que ninguno de los lechones inoculados seroconvirtió después de 21 días de la inoculación experimental, con la única excepción del testigo positivo y del lechón inoculado con semen procedente del verraco número 14.

Tabla 21: Resultados del aislamiento del VSRRP en las muestras de órganos del aparato reproductor recogidas en la necropsia de los verracos.

Muestra	Número del verraco y día de sacrificio del mismo																			
	V1D2	V2D2	V3D3	V4D4	V5D4	V6D5	V7D6	V8D6	V9D7	V10D8	V11D8	V12D9	V13D10	V14D10	V15D13	V16D13	V17D17	V18D23	V19D30	V20D37
G.L.T.I.	+	Ø	Ø	-	+	+	+	+	Ø	+	+	+	Ø	+	+	+	+	Ø	-	-
	(2)				(<2)	(<2)	(2,87)	(3,70)		(2)	(3,50)	(2,5)		(<2)	(<2)	(<2)	(3,30)			
G.L.T.D.	Ø	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	Ø	-	Ø	+	+	Ø	-	-
		(3,11)		(3,5)	(2,88)	(2,88)	(4,11)	(2,61)	(3,7)	(2)	(3,50)	(<2)				(2)	(3,23)			
T.I.	-	-	Ø	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
								(2)												
C.E.I.	-	-	Ø	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	+	+	-	-	-
				(3,50)			(<2)	(2,71)	(2,58)		(2)			(2)		(<2)	(<2)			
Cu.E.I.	-	-	Ø	+	-	-	+	+	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-
				(<2)			(<2)	(<2)	(2,58)					(2,5)						
Co.E.I.	-	-	Ø	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
								(<2)	(2,41)											
T.D.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
								(<2)												
C.E.D.	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	+	-	-	-
				(3,70)			(2,5)	(<2)	(3,23)		(<2)			(2)			(2,5)			
Cu.E.D.	-	-	-	+	-	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
				(2)			(<2)		(2,80)											
Co.E.D.	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
				(2,88)					(<2)								(2)			
Gl.B.I.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-
															(2,5)		(2)			
Gl.B.D.	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
								(<2)												
V.S.I.	-	-	-	Ø	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
							(2)													
V.S.D.	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-
																	(2)			
Próstata	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-
					(<2)		(<2)					(<2)					(2)		(2)	

G.L.T.I.: ganglio linfático testicular izquierdo; G.L.T.D.: ganglio linfático testicular derecho; T.I.: testículo izquierdo; C.E.I.: cabeza del epidídimo izquierdo; Cu.E.I.: cuerpo del epidídimo izquierdo; Co.E.I.: cola del epidídimo izquierdo; T.D.: testículo derecho; C.E.D.: cabeza del epidídimo derecho; Cu.E.D.: cuerpo del epidídimo derecho; Co.E.D.: cola del epidídimo derecho; Gl.B.I.: glándula bulbo uretral izquierda; Gl.B.D.: glándula bulbo uretral derecha; V.S.I.: vesícula seminal izquierda; V.S.D.: vesícula seminal derecha; Ø: muestra no recogida.
 Los títulos víricos están calculados en la forma de DI_{50}/g de tejido y aparecen expresados en forma de log X, siendo X el número que figura entre paréntesis.

4.2.4. Distribución del VSRRP en los distintos órganos, exceptuando el aparato reproductor, tras la inoculación experimental

Todas las muestras de sangre obtenidas en el día 0 fueron negativas en cultivos de MAP al VSRRP. Las muestras obtenidas después de la inoculación experimental de los verracos con el VSRRP fueron todas positivas en los días 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8 y 9 p.i., con la excepción del verraco 20 en el día 6 y el verraco 10 en el día 8 p.i., variando los resultados obtenidos, en función del animal estudiado a partir de ese momento. Los resultados obtenidos en el aislamiento vírico, así como los títulos víricos de las muestras positivas aparecen en la tabla 22.

En los órganos no pertenecientes al aparato reproductor recogidos en la necropsia de los animales, los resultados obtenidos en las pruebas de aislamiento vírico en cultivos de MAP demostraron que es posible aislar el VSRRP, fundamentalmente del sistema ganglionar y del pulmón durante periodos de tiempo de hasta 30 días, estando ampliamente distribuido por el organismo hasta, al menos, el día 17 p.i., momento a partir del cual hubo órganos que fueron negativos de forma sistemática como el hígado, el bazo, el timo o algunos ganglios linfáticos. Los órganos en los que se detectó el virus durante periodos de tiempo más prolongados fueron los ganglios linfáticos submandibulares e inguinales superficiales, las amígdalas y los pulmones. Por el contrario, de los órganos estudiados, fue el hígado el menos adecuado para el aislamiento vírico, siendo positivos, y con títulos víricos muy bajos, sólo 6 de los 19 estudiados. Los resultados obtenidos en el aislamiento del VSRRP en los distintos órganos y los títulos víricos de las muestras positivas se muestran en la tabla 23.

4.2.5. Estudio de eliminación del VSRRP por las distintas vías

Los intentos de aislamiento vírico en cultivos de MAP llevados a cabo con las muestras procedentes de secreciones nasales, oro-faríngeas y prepuciales, heces y orina aparecen en la tabla 24, junto con los títulos víricos de las muestras positivas. En esta tabla se observa que el VSRRP se eliminó por todas estas vías, aunque su aislamiento fue muy esporádico, siendo positivas únicamente 5 de las muestras de secreciones nasales, 2 de las muestras de secreciones oro-faríngeas, 4 de las muestras de secreciones prepuciales, 6 de las muestras de heces y 5 de las muestras de orina.

Tabla 22: Resultados del aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP en las muestras de sangre recogidas durante el periodo de estudio.

Nº del verraco		Día de obtención de las muestras														
(Día de sacrificio)		D0	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D13	D17	D23	D30	D37
Verraco 1	(D2)	-	+(2,88)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 2	(D2)	-	+(2,30)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 3	(D3)	-	ND	+(3,50)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 4	(D4)	-	ND	ND	+(2,30)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 5	(D4)	-	ND	ND	+(2,30)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 6	(D5)	-	ND	ND	+(2,30)	+(2,23)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 7	(D6)	-	ND	ND	+(2,41)	ND	+(1,56)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 8	(D6)	-	ND	ND	+(2,11)	ND	+(2,41)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 9	(D7)	-	ND	ND	+(1,75)	ND	+(1,58)	+(1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 10	(D8)	-	ND	ND	+(2,30)	ND	+(1,60)	ND	-	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 11	(D8)	-	ND	ND	+(2,41)	ND	+(1,88)	ND	+(1)	ND	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 12	(D9)	-	ND	ND	+(2,90)	ND	+(2,30)	ND	ND	+(1,50)	ND	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 13	(D10)	-	ND	ND	+(2,58)	ND	+(2,58)	ND	ND	+(2,28)	+(<1)	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 14	(D10)	-	ND	ND	+(2,11)	ND	+(<1)	ND	ND	+(1,50)	-	ND	ND	ND	ND	ND
Verraco 15	(D13)	-	ND	ND	+(3)	ND	+(2,41)	ND	ND	+(1,50)	ND	-	ND	ND	ND	ND
Verraco 16	(D13)	-	ND	ND	+(3)	ND	+(2,41)	ND	ND	+(1,86)	ND	-	ND	ND	ND	ND
Verraco 17	(D17)	-	ND	ND	+(2,40)	ND	+(2,20)	ND	ND	+(1,58)	ND	+(1)	+(1)	ND	ND	ND
Verraco 18	(D23)	-	ND	ND	+(2,50)	ND	+(1)	ND	ND	+(2,11)	ND	-	-	+(<1)	ND	ND
Verraco 19	(D30)	-	ND	ND	+(2,30)	ND	+(1,50)	ND	ND	+(2,50)	ND	+(1,58)	+(1,41)	+(<1)	-	ND
Verraco 20	(D37)	-	ND	ND	+(2,50)	ND	-	ND	ND	+(2,50)	ND	+(1)	+(1)	-	-	-

ND: muestra no disponible.

Los títulos víricos de las muestras positivas están calculados en la forma de $DI_{50}CT/mL$ y aparecen expresados en la forma de $\log X$, siendo X el número que figura entre paréntesis.

Tabla 23: Resultados del aislamiento del VSRRP en las muestras de los distintos órganos, excluyendo el aparato reproductor, recogidas en la necropsia de los verracos.

Muestra	Número del verraco y día de sacrificio del mismo																			
	V1D2	V2D2	V3D3	V4D4	V5D4	V6D5	V7D6	V8D6	V9D7	V10D8	V11D8	V12D9	V13D10	V14D10	V15D13	V16D13	V17D17	V18D23	V19D30	V20D37
G.L.S.I.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
	(2,70)	(2,50)	(4,30)	(4,41)	(3,58)	(3,70)	(3,23)	(3,88)	(2,50)	(2,50)	(3,11)	(2,50)	(2,90)	(3,50)	(2,58)	(3,61)	(4,70)		(<2)	
G.L.S.D.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	(2,30)	(2,80)	(4,30)	(4,23)	(3,70)	(3,30)	(3,64)	(4,15)	(3,41)	(2,50)	(3,50)	(3,11)	(3,30)	(3,50)	(2,58)	(2,50)	(4,50)	(2)	(2,58)	
Amígdala	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	(2,88)	(3,11)	(4,30)	(4,50)	(3,50)	(4,11)	(3,58)	(3,40)	(2,50)	(2,50)	(2,50)	(3,46)	(2,88)	(3,50)	(2,58)	(2,58)	(3,50)	(3,50)	(2,50)	
G.L.P.T.	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
			(2,61)	(2,50)	(3,50)	(2,50)	(3,11)	(3,60)	(3,50)	(3,11)	(2,50)	(2,80)	(2,41)	(2,58)	(6,5)	(2,50)	(4,15)			
G.L.Med.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	(<2)	(2,88)	(3,88)	(3,50)	(4,11)	(4,38)	(2,67)	(3,46)	(2,88)	(3,15)	(2,50)	(3)	(2)	(2,41)	(2)	(2)	(3,11)			
Pulmón	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-
	(<2)	(3)	(3,70)	(5,26)	(4,20)	(4,30)	(4,28)	(4,88)	(3,41)	(3,58)	(3)	(2,50)		(4,11)	(3,60)	(3,61)	(4,40)	(2,41)	(2,50)	
Timo	Ø	Ø	Ø	+	+	+	+	Ø	+	+	+	+	-	+	-	-	+	-	-	-
				(3,61)	(4)	(3,70)	(3,50)		(2,58)	(2)	(2,50)	(3,70)		(2,41)			(2,61)			
G.L.Mes.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	-	+	-
	(2)	(2)	(3,58)	(2,88)	(3,70)	(3,58)	(2,50)	(3,58)	(2,50)	(3,11)	(3,70)	(3,36)	(2)	(2,70)		(2,50)	(2,75)		(2,88)	
Pl. Peyer	+	+	+	+	+	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø	+	+	+	+	+	+	-	-	-
	(2)	(2,54)	(4,38)	(2,70)	(3,70)			(4,30)	(2,88)			(2,70)	(2,58)	(2,41)	(2,41)	(<2)	(2,70)			
G.L.I.S.I.	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
		(2,41)	(4,11)	(3,58)	(3,58)	(3,30)	(4)	(2,58)	(2,70)	(2,50)	(2,50)	(2,58)	(2,50)	(2,88)	(2,50)	(2,41)	(2,58)	(2)	(2)	
G.L.I.S.D.	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
	(2)	(2,50)	(2,88)	(3,50)	(2,58)	(2,70)	(2,67)	(2,58)	(2,11)	(2,58)	(2,58)	(2,50)	(2,50)	(2,50)	(2)	(2,50)	(2,70)	(2)	(2,50)	
Hígado	-	-	Ø	+	+	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	+	-	-	-
				(2)	(<2)		(2,58)	(<2)						(<2)			(<2)			
Bazo	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-	-	+	-	-	-	-	-
			(2)	(2,70)	(2,50)	(2,57)	(2,50)	(2,58)	(3,67)	(2,58)	(3,50)				(<2)					

G.L.S.I.: ganglio linfático submandibular izquierdo; G.L.S.D.: ganglio linfático submandibular derecho; G.L.P.T.: ganglios linfáticos paratraqueales; G.L.Med.: ganglios linfáticos mediastínicos; G.L.Mes.: ganglios linfáticos mesentéricos; Pl. Peyer: placas de Peyer; G.L.I.S.I.: ganglio linfático inguinal superficial izquierdo; G.L.I.S.D.: ganglio linfático inguinal superficial derecho; Ø: muestra no tomada.

Los títulos víricos están calculados en la forma de $DI_{50}CT/g$ de tejido y aparecen expresados como log X, siendo X el número que figura entre paréntesis.

Tabla 24: Resultados del aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP a partir de los distintos hisopos y muestras de orina tomadas en la necropsia de los verracos en el periodo de estudio.

Muestra	Número del verraco y día post-inoculación de la toma de las muestras																			
	V1D2	V2D2	V3D3	V4D4	V5D4	V6D5	V7D6	V8D6	V9D7	V10D8	V11D8	V12D9	V13D10	V14D10	V15D13	V16D13	V17D17	V18D23	V19D30	V20D37
H. nasal	-	-	+	+	+	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
			(2,41)	(<1)	(1,76)	(2,11)	(1)													
H. oro-far.	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
						(1)						(1,50)								
H. prep.	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	-	-	-
					(<1)	(2)						(1,50)					(<1)			
H. heces	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+	+	-	-	-	-	+	+	-	-
									(1,50)	(<1)	(<1)	(<1)					(<1)	(1,50)		
Orina	-	-	+	-	-	-	-	+	-	+	-	-	-	+	-	+	-	-	-	-
			(1,50)					(1,41)		(1,41)				(1,50)		(1,41)				

H. nasal: hisopo de las secreciones nasales; H. oro-far.: hisopo tomado de la cavidad oro-faríngea; H. prep.: hisopo tomado del divertículo del prepucio; H. heces: hisopo de heces. Los títulos de las muestras positivas están calculados como $DI_{50}CT/mL$ y aparecen expresados en la forma de log X, siendo X el número que figura entre paréntesis.

4.3 Estudio de la infección por el VSRRP en los verracos: transmisión venerea de la enfermedad y efecto de la presencia del VSRRP en el semen sobre la eficacia reproductiva (objetivos A.6 y A.7)

4.3.1. Sintomatología clínica

Ninguna de las cerdas del grupo A (seronegativas) mostró ningún síntoma respiratorio después de la inseminación artificial con semen contaminado con el VSRRP. Por el contrario, la mayoría de los animales sí presentaron anorexia o al menos inapetencia durante 1 ó 2 días tras la inseminación artificial. En concreto, las cerdas 1 y 2 estuvieron inapetentes en el día 3 post-inseminación, las cerdas 4 y 5 rehusaron totalmente la comida en este mismo día, estando esta última también inapetente en el día 2 post-inseminación y por último la cerda 6 no comió nada en el día 5 post-inseminación. En el grupo B (preinmunizadas) todas las cerdas permanecieron en buenas condiciones durante toda la duración de la prueba, con la excepción de la cerda 14 que mostró anorexia en el día 2 post-inseminación. Las cerdas del grupo C (testigos) permanecieron normales a lo largo del experimento.

Las temperaturas rectales de los animales, representadas en la tabla 25, experimentaron un aumento tras la inseminación en los grupos A y B y permanecieron normales en el grupo C. Sin embargo, sólo 4 de las 7 cerdas pertenecientes al grupo A alcanzaron temperaturas superiores a los 39,7°C, temperatura considerada febril por nosotros. Estas cerdas fueron la número 3 en los días 6 y 16 post-inseminación, la número 4 en el día 3, la número 5 en los días 3, 5 y 9 y la número 7 en el día 9, con temperaturas que oscilaron entre los 39,76°C y los 40,60°C. En el grupo B por el contrario, 6 de las 7 cerdas que lo integraban mostraron temperaturas febriles tras la inseminación con semen contaminado con el VSRRP. Estas cerdas fueron la número 8 en el día 1, la número 10 en el día 5, la número 11 en los días 5 y 8, la número 12 en los días 1, 3 y 6, la número 13 en los días 1, 3, 5 y 6 y la número 14 en el día 5. Las temperaturas alcanzadas por las cerdas de este grupo fueron superiores a las alcanzadas por las cerdas del grupo A, oscilando entre los 39,83°C y los 41,79°C. Las cerdas pertenecientes al grupo C tuvieron temperaturas que se mantuvieron dentro del rango de la normalidad a lo largo de todo el periodo de estudio.

Tabla 25: Temperaturas rectales de las cerdas de los grupos A, B y C a lo largo del periodo de estudio.

Día Post- Inseminación	Número de las cerdas																				
	Grupo A							Grupo B							Grupo C						
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18	19	20	21
1	39,03	38,23	38,92	39,30	39,18	38,76	38,06	40,39	38,79	38,65	39,19	41,37	40,07	38,23	37,73	38,89	37,99	38,55	37,22	37,41	38,86
2	38,20	38,60	39,16	39,14	38,55	39,20	38,62	38,90	39,08	39,04	39,26	38,47	38,59	39,03	38,31	38,07	37,67	38,43	38,81	38,69	37,95
3	37,04	38,18	38,03	40,60	40,29	38,56	38,45	39,03	39,09	38,55	37,59	40,24	39,83	38,44	38,53	38,89	38,69	38,77	38,33	39,11	38,30
4	39,62	39,07	38,09	39,02	39,40	39,20	39,09	38,09	39,08	38,56	38,40	39,05	39,17	39,42	38,19	38,62	38,10	38,58	38,12	38,40	38,37
5	38,99	38,82	39,59	38,89	39,79	38,54	38,93	38,98	39,47	40,01	40,22	39,66	41,79	39,85	38,58	38,91	38,89	38,63	38,93	38,78	38,52
6	37,75	38,61	39,99	38,80	39,19	38,91	39,61	38,27	37,63	38,94	39,07	39,88	40,44	39,39	38,86	39,20	39,15	38,71	39,00	38,73	38,77
7	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	39,10	38,41	39,68	40,48	39,03	38,42	39,02	39,21	38,73	38,72	39,83	39,02	39,05	38,93	38,72	39,23	38,69	38,72	38,91	38,28	38,67
9	37,91	38,69	39,03	39,05	39,76	39,26	39,74	39,14	39,46	39,34	38,69	38,69	38,29	38,96	38,05	39,23	38,86	38,24	38,93	38,46	38,04
10	38,39	37,98	38,86	38,07	37,94	38,05	39,04	37,83	39,36	37,92	38,10	38,62	39,01	38,11	38,68	39,11	38,89	38,87	38,88	38,63	38,62
11	38,02	38,27	38,37	38,68	39,10	38,46	39,31	38,50	38,48	38,53	38,82	38,05	38,40	37,84	-	-	-	-	-	-	-
12	38,24	39,26	39,14	38,36	39,14	39,01	38,59	38,82	38,56	39,06	38,72	38,23	38,72	39,16	-	-	-	-	-	-	-
13	38,16	38,04	38,31	38,49	38,05	38,39	38,51	38,16	37,86	37,15	37,95	38,46	38,59	38,05	-	-	-	-	-	-	-
14	38,51	39,21	38,71	38,56	39,03	38,71	38,53	39,11	38,61	37,57	38,27	38,49	39,02	39,14	-	-	-	-	-	-	-
15	38,98	39,15	38,16	39,01	38,56	38,27	38,75	38,96	38,70	38,00	38,50	38,27	39,04	39,25	-	-	-	-	-	-	-
16	38,70	38,16	39,91	38,40	38,25	38,35	38,62	38,54	38,15	38,50	38,27	38,20	38,85	38,87	-	-	-	-	-	-	-
17	37,23	37,50	37,45	38,23	38,64	37,37	38,22	38,23	37,18	36,55	37,13	37,92	38,63	38,26	-	-	-	-	-	-	-
18	37,84	38,33	38,36	38,64	38,16	38,06	38,43	38,32	38,52	38,37	37,85	38,68	38,52	37,79	-	-	-	-	-	-	-

4.3.2. Serología

Los resultados de las pruebas serológicas realizadas en las cerdas de los 3 grupos aparecen en la tabla 26. En ella se puede observar que las 4 primeras muestras de suero procedentes de las cerdas de los grupo A y B, así como todas las muestras procedentes de las cerdas del grupo C, fueron negativas a la presencia de anticuerpos frente al VSRRP mediante la técnica de ELISA, con la excepción de la cerda número 12, perteneciente al grupo B, que fue positiva en los días -3, +3 y +6, con títulos de anticuerpos de 1:200, 1:400 y 1:200 respectivamente y de las cerdas 11 y 14 en el día 6 post-inseminación, ambas con un título de anticuerpos <1:200. Por el contrario, las muestras de suero obtenidas de todas las cerdas de los grupos A y B en los días 15 y 20 p.i. fueron positivas con títulos que oscilaron entre 1:200 y >1:1600.

Resultados

Tabla 26: Resultados de los estudios serológicos llevados a cabo en las cerdas de los grupos A, B y C a lo largo del periodo de estudio.

Nº de la cerda	Grupo	Día de obtención de la muestra					
		DA	D-3	D3	D6	D15	D20
1	A	-	-	-	-	+	+
2	A	-	-	-	-	(1:800)	(≥1:1600)
3	A	-	-	-	-	+	+
4	A	-	-	-	-	(1:400)	(1:400)
5	A	-	-	-	-	+	+
6	A	-	-	-	-	(1:800)	(≥1:1600)
7	A	-	-	-	-	+	+
8	B	-	-	-	-	(1:800)	(≥1:1600)
9	B	-	-	-	-	+	+
10	B	-	-	-	-	(≥1:1600)	(≥1:1600)
11	B	-	-	-	-	+	+
12	B	-	-	-	-	(1:200)	(1:200)
13	B	-	-	-	-	+	+
14	B	-	-	-	-	(1:800)	(1:800)
15	C	-	-	-	-	-	-
16	C	-	-	-	-	-	-
17	C	-	-	-	-	-	-
18	C	-	-	-	-	-	-
19	C	-	-	-	-	-	-
20	C	-	-	-	-	-	-
21	C	-	-	-	-	-	-

DA: Día de la adquisición de los animales.

Los títulos obtenidos utilizando la técnica de ELISA figuran entre paréntesis debajo del +.

4.3.3. Efecto de la exposición al VSRRP por la vía intrauterina sobre la reproducción

La tabla 27 muestra el número de cuerpos luteos, el número de embriones, vivos y muertos, y la relación embriones:cuerpos luteos, además del número de embriones infectados, de cada una de las cerdas de los grupos A, B y C. La tabla 28 muestra los valores medios obtenidos en cada uno de los grupos. En el grupo A hubo 1 cerda (número 7) y en el grupo B 2 (números 10 y 13) que no estaban gestantes en el día 20 después de la inseminación artificial, aunque presentaban *corpora albicans* y folículos en desarrollo en los ovarios, lo cual indica que presentaban actividad ovárica e iban a volver a salir a celo. Todas las cerdas del grupo C estaban gestantes en el momento del sacrificio. Estas diferencias en el porcentaje cerdas gestantes no fue estadísticamente significativo y los valores obtenidos se puede considerar que están dentro de lo normal en cerdas nulíparas. Como se puede observar en la tabla 27, hubo marcadas diferencias en el número de cuerpos luteos, el número de embriones y la relación embriones:cuerpos luteos encontrados en cada una de las cerdas, estudiadas de forma individual. Sin embargo, estudiados en su conjunto, el número total de cuerpos luteos, el número total de embriones y la relación embriones:cuerpos luteos fue similar para los tres grupos (tabla 28). Por el contrario, el número de embriones muertos fue bastante superior en las cerdas de los grupos A y B, comparado con el obtenido en el grupo grupo C, ya que los dos primeros grupos presentaron un número de embriones muertos 2 y 4 veces respectivamente superior al número de embriones muertos en las cerdas del grupo C. El estudio estadístico llevado a cabo demostró que existían diferencias estadísticamente significativas en este parámetro entre las cerdas de los grupos B y C ($p<0,001$) y entre las cerdas de los grupos A y B ($p<0,001$).

En el porcentaje de camadas y embriones infectados también se observaron diferencias importantes, ya que en el grupo A 5 de las 6 camadas estaban infectadas, con un porcentaje medio de embriones infectados del 7,6%, mientras que en el grupo B sólo 1 de las 5 camadas lo estaba, con un porcentaje medio de embriones infectados del 1,3%. Sin embargo, estas diferencias no fueron estadísticamente significativas. No fue posible aislar el VSRRP de ninguno de los embriones procedentes de las cerdas del grupo C. Los embriones infectados en las cerdas del grupo A fueron los embriones que ocupaban las posiciones tercera del cuerno uterino derecho de la cerda 1, sexta del cuerno uterino izquierdo y segunda del cuerno uterino derecho de la cerda 2, segunda y octava del cuerno uterino izquierdo de la cerda 3, séptima del cuerno uterino derecho de la cerda 4 y sexta del cuerno uterino izquierdo de la cerda 6. Los títulos víricos obtenidos en cultivos de MAP para cada uno de estos embriones fueron los siguientes: log 3,50, log 2,50, log 2,20, log 2,41, log 2,50, log 2,41 y log 3,50 DI₅₀CT/g de tejido respectivamente.

Tabla 27: Número de cuerpos luteos, embriones y embriones infectados por el VSRRP obtenidos tras la inseminación de cerdas seronegativas y preinmunizadas con semen contaminado con el VSRRP.

Nº de la cerda	Grupo	Cuerno uterino izquierdo					Cuerno uterino derecho					Total					
		C.L.	NEV.	NEV.I.	NEM.	N.E.M.I.	C.L.	NEV.	NEV.I.	NEM.	N.E.M.I.	C.L.	NEV.	NEV.I.	NEM.	N.E.M.I.	R.C.L.:E.
1	A	14	1	0	3	0	10	1	0	2	1	24	2	0	5	1	0,29
2	A	4	6	1	0	0	11	6	1	1	0	15	12	2	1	0	0,87
3	A	10	8	1	3	1	16	9	0	2	0	26	17	1	5	1	0,85
4	A	13	11	0	0	0	9	8	0	3	1	22	19	0	3	1	1
5	A	9	9	0	0	0	8	7	0	0	0	17	16	0	0	0	0,94
6	A	12	6	1	1	0	5	5	0	0	0	17	11	1	1	0	0,71
7	A	7*	0	0	0	0	1*	0	0	0	0	8*	0	0	0	0	0
8	B	10	4	0	5	0	8	5	0	4	0	18	9	0	9	0	1
9	B	9	0	0	9	0	6	0	0	5	0	15	0	0	14	0	0,93
10	B	25*	0	0	0	0	32*	0	0	0	0	59*	0	0	0	0	0
11	B	11	10	0	0	0	9	10	0	0	0	20	20	0	0	0	1
12	B	15	4	1	0	0	9	4	0	2	0	24	8	1	2	0	0,42
13	B	12*	0	0	0	0	13*	0	0	0	0	25*	0	0	0	0	0
14	B	4	3	0	4	0	12	4	0	3	0	16	7	0	7	0	0,88
15	C	12	8	0	2	0	14	12	0	1	0	26	20	0	3	0	0,88
16	C	10	8	0	0	0	5	7	0	0	0	15	15	0	0	0	1
17	C	15	9	0	4	0	14	11	0	0	0	29	20	0	4	0	0,83
18	C	4	4	0	0	0	12	5	0	0	0	16	9	0	0	0	0,56
19	C	8	6	0	0	0	12	11	0	0	0	20	17	0	0	0	0,85
20	C	10	1	0	1	0	10	4	0	0	0	20	5	0	1	0	0,30
21	C	9	9	0	1	0	9	6	0	2	0	18	15	0	3	0	1

C.L.: número de cuerpos luteos; N.E.V.: número de embriones vivos; N.E.V.I.: número de embriones vivos infectados; N.E.M.: número de embriones muertos; N.E.M.I.: número de embriones muertos infectados; R.C.L.:E.: relación cuerpos luteos:embriones.

Las cifras de las columnas C.L. que van acompañadas de * son *corpora albicans*.

Resultados

El único embrión infectado en las cerdas del grupo B fue el que ocupaba la posición primera del cuerno uterino izquierdo de la cerda 12 que presentó un título vírico en cultivos de MAP de $\log 3 \text{ DI}_{50}\text{CT/g}$ de tejido. Todas las muestras de líquidos atlantoideos estudiadas fueron negativas al aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP.

Tabla 28: Valores medios del número de cuerpos luteos, embriones, vivos y muertos y embriones infectados en las cerdas pertenecientes a los grupos A, B y C a los 20 días de la inseminación artificial con semen contaminado con el VSRRP.

	Grupo A	Grupo B	Grupo C
Nº de cerdas preñadas	6	5	7
Nº cerdas vacías	1	2	0
Nº camadas infectadas	5	1	0
Porcentaje de camadas infectadas	83,3	20	0
Nº de cuerpos luteos (rango)	120 (15-26)	93 (16-24)	144 (15-29)
Nº total de embriones (rango)	92 (7-22)	76 (10-20)	112 (6-24)
Nº de embriones/Nº de cuerpos luteos	0,77	0,82	0,78
Nº de embriones vivos (%)	77 (83,7)	44 (57,9)	101 (90,2)
Nº de embriones vivos infectados (%)	4 (5,2)	1 (2,3)	0 (0)
Nº de embriones muertos (%)	15 (16,3)	32 (42,1)	11 (9,8)
Nº de embriones muertos infectados (%)	3 (20)	0 (0)	0 (0)
Porcentaje de embriones infectados	7,6	1,3	0

4.3.4. Detección del VSRRP en las distintas muestras recogidas

Los resultados de los intentos de aislamiento vírico en las muestras de suero y en los hisopos nasales obtenidos a lo largo del periodo de estudio figuran en la tabla 29. En ella se puede apreciar que todas las muestras recogidas en los distintos grupos en el día -3 fueron negativas al VSRRP. Por el contrario, en los días 3 y 6 la mayoría de las muestras procedentes de las cerdas de los grupos A y B fueron positivas, con títulos víricos que oscilaron entre $<\log 2 \text{ DI}_{50}\text{CT/mL}$ y $\log 5,5 \text{ DI}_{50}\text{CT/mL}$. En el día 15 sólo 3 de las cerdas estudiadas fueron positivas, mientras que en el momento del sacrificio todas las cerdas del grupo B fueron negativas y sólo una cerda del grupo A permanecía positiva, con un título vírico de $\log 4,40 \text{ DI}_{50}\text{CT/mL}$. En cuanto a los hisopos nasales, sólo una de las muestras, obtenida en el día 6 de la cerda 13 del grupo B, fue positiva al VSRRP en cultivos de MAP, con un título $<\log 2 \text{ DI}_{50}\text{CT/mL}$. Todas las muestras procedentes de las cerdas del grupo C fueron negativas.

Resultados

En la tabla 30 se resumen los resultados del aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP a partir de los órganos recogidos en la necropsia, con la excepción de los embriones, cuyos resultados ya han sido expuestos. El VSRRP se pudo aislar de todas las amígdalas, de 6 de los pulmones, de 4 de los ganglios linfáticos inguinales superficiales y de 5 de los ganglios linfáticos submandibulares de las cerdas del grupo A. En las muestras procedentes de las cerdas del grupo B fue posible aislar el VSRRP de 5 de las amígdalas, de 5 de los pulmones, de 5 de los ganglios linfáticos inguinales superficiales y de 6 de los ganglios linfáticos submandibulares. Todas las muestras procedentes de las cerdas del grupo C fueron negativas.

En los órganos procedentes del aparato reproductor y en los ganglios linfáticos que lo drenan fue posible el aislamiento del VSRRP a partir de 3 de los ovarios de las cerdas del grupo A (ovario derecho de la cerda 5 y ovarios izquierdo y derecho de la cerda 7), así como de la muestra de útero procedente de la cerda 7, mientras que en el grupo B todas las muestras de ovarios y úteros estudiadas fueron negativas. De los ganglios linfáticos uterinos fue posible aislar el VSRRP en las cerdas 1, 3 y 5 del grupo A y 8, 12 y 14 del grupo B. Todas las muestras procedentes de las cerdas del grupo C fueron negativas.

Los títulos víricos obtenidos en las muestras del aparato reproductor fueron en general bajos, oscilando entre $< \log 2$ y $\log 3,8$ $DI_{50}CT/g$ de tejido.

Resultados

Tabla 29: Resultados del aislamiento del VSRRP a partir de las muestras de suero y de los hisopos nasales obtenidos a lo largo del periodo de estudio de las cerdas de los grupos A, B y C.

Cerde	Grupo	Muestras de suero					Muestras de hisopos nasales				
		D-3	D3	D6	D15	D20	D-3	D3	D6	D15	D20
1	A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			(5)								
2	A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			(4,32)								
3	A	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
			(4,32)	(2,71)	(3,40)						
4	A	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
			(5,5)	(2)							
5	A	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-
			(4,57)								
6	A	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
			(4,41)	(2)							
7	B	-	-	+	+	+	-	-	-	-	-
				(5)	(3,75)	(4,40)					
8	B	-	-	+	-	-	-	-	-	-	-
				(3,66)							
9	B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
			(4,80)	(3,66)							
10	B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
			(4)	(2)							
11	B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
			(4)	(<2)							
12	B	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-
			(3,66)	(4)							
13	B	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-
			(5,38)	(5)					(<2)		
14	B	-	+	+	+	-	-	-	-	-	-
			(4,80)	(4,57)	(3,57)						
15	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Los títulos víricos están calculados como $DI_{50}CT/mL$ y están expresados en la forma de $\log X$, siendo X el número que aparece entre paréntesis.

Resultados

Tabla 30: Resultados del aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP a partir de las muestras de distintos órganos recogidos en la necropsia de las cerdas de los grupos A, B y C.

Cerde	Grupo	Órganos del aparato reproductor					Otros órganos			
		Ov.I.	Ov.D.	Útero	G.L.U.I.	G.L.U.D.	Amig.	Pulmón	G.L.I.S.I.	G.L.S.I.
1	A	-	-	-	+	Ø	+	+	+	-
					(2)		(<2)	(2,5)	(<2)	
2	A	-	-	-	-	Ø	+	+	-	+
							(2,66)	(3,74)		(2)
3	A	-	-	-	+	-	+	+	+	+
					(<2)		(3,89)	(3,32)	(3)	(3,66)
4	A	-	-	-	-	-	+	+	+	+
							(3,57)	(<2)	(2)	(3,55)
5	A	-	+	-	-	+	+	-	+	+
			(3,80)			(3,59)	(3,59)		(2,89)	(2,40)
6	A	-	-	-	-	Ø	+	+	-	+
							(2,40)	(2,61)		(2)
7	A	+	+	+	Ø	Ø	+	-	-	-
		(3,66)	(3,40)	(2)			(4,40)			
8	B	-	-	-	-	+	+	+	+	+
						(2)	(2,80)	(2,66)	(<2)	(2,80)
9	B	-	-	-	Ø	Ø	+	+	-	+
							(2,80)	(<2)		(3,80)
10	B	-	-	-	Ø	Ø	-	+	+	+
								(2,59)	(4,28)	(3,66)
11	B	-	-	-	-	Ø	+	-	-	-
							(<2)			
12	B	-	-	-	+	+	+	+	+	+
					(3,66)	(2,57)	(3,80)	(3,71)	(4)	(4)
13	B	-	-	-	Ø	Ø	+	-	+	+
							(2,66)		(3,49)	(4,49)
14	B	-	-	-	+	+	-	+	+	+
					(2,59)	(3,41)		(3,71)	(2,57)	(3,40)
15	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
19	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	C	-	-	-	-	-	-	-	-	-

Ov.I.: ovario izquierdo; Ov.D.: ovario derecho; G.L.U.I.: ganglio linfático uterino izquierdo; G.L.U.D.: ganglio linfático uterino derecho; Amig.: amígdala; G.L.I.S.I.: ganglio linfático inguinal superficial izquierdo; G.L.S.I.: ganglio linfático submandibular izquierdo.

Los títulos víricos están calculados como $DI_{50CT/g}$ de tejido y están expresados en la forma de $\log X$, siendo X el número que aparece entre paréntesis.

4.4. Estudio del efecto de la exposición de cerdas nulíparas al VSRRP en el día 0 de gestación: sintomatología asociada a la infección, efecto sobre las tasas de concepción y fertilización, efecto sobre el desarrollo embrionario y susceptibilidad de los embriones a la infección por el virus (objetivos B.1, B.2, B.3 y B.4)

4.4.1. Signos clínicos

Ninguna de las cerdas de este estudio mostró ningún síntoma respiratorio. Sin embargo, algunas de las cerdas de los grupos A y C (cerdas inoculadas con el VSRRP) mostraron anorexia o inapetencia durante 2 ó 3 días. Así, en el grupo A, la cerda número 1 presentó anorexia en los días 2 y 6 p.i. y inapetencia en el día 4, la cerda 2 mostró anorexia en el día 3 e inapetencia en los días 7 y 8 p.i., la cerda 3 no comió en el día 2 p.i. y la cerda 4 estuvo inapetente en el día 3 p.i.. En el grupo C, la cerda 14 mostró anorexia en los días 2, 3 y 7 e inapetencia en los días 4, 5, 6, 8, 9 y 10 p.i., la cerda 16 estuvo inapetente en los días 2 y 3 p.i. y la cerda 17 en los días 2, 3 y 5 p.i. y la cerda 18 presentó anorexia en el día 6 e inapetencia en el día 3 p.i.. Por el contrario las cerdas de los grupos B y D (cerdas testigos) permanecieron normales durante todo el experimento.

Las temperaturas rectales de todas las cerdas durante el periodo de estudio se muestran en la tabla 31. Las cerdas pertenecientes al grupo A experimentaron un aumento de temperatura tras la inoculación con el VSRRP que empezó en algunos de los animales en el día 1 p.i. y duró, en ocasiones, hasta el día 8. Las temperaturas alcanzadas oscilaron entre los 39,93°C y los 41,67°C. En el grupo C también se observó un aumento en las temperaturas rectales, fundamentalmente entre los días 2 y 6 p.i., siendo la temperatura más alta alcanzada de 40,98°C. En los grupos B y D las temperaturas rectales permanecieron dentro del rango de la normalidad durante todo el experimento.

Tabla 31: Temperaturas rectales de las cerdas de los grupos A, B, C y D a lo largo del experimento.

Cerda Grupo		Día post-inoculación																	
		D1	D2	D3	D4	D5	D6	D7	D8	D9	D10	D11	D12	D13	D14	D15	D16	D17	D18
1	A	38,23	41,67	38,36	39,03	39,93	40,59	39,33	39,20	37,63	38,51	-	-	-	-	-	-	-	-
2	A	40,04	39,47	38,89	39,43	40,28	39,07	39,47	40,29	38,24	38,31	-	-	-	-	-	-	-	-
3	A	39,07	39,05	36,51	38,40	39,36	39,04	37,85	37,63	38,37	38,62	-	-	-	-	-	-	-	-
4	A	40,46	38,67	40,42	39,47	39,96	39,52	39,75	40,05	39,45	39,17	-	-	-	-	-	-	-	-
5	A	38,88	38,91	40,15	39,57	40,53	39,31	39,43	39,18	38,72	38,62	-	-	-	-	-	-	-	-
6	A	38,43	40,99	38,46	38,56	39,53	39,21	39,25	39,73	38,51	39,36	-	-	-	-	-	-	-	-
7	B	38,48	37,97	37,88	38,25	38,42	38,17	38,35	38,57	38,23	38,72	-	-	-	-	-	-	-	-
8	B	38,34	39,18	38,86	38,76	39,09	38,71	38,82	38,82	38,65	40,20	-	-	-	-	-	-	-	-
9	B	38,64	38,72	38,69	38,68	38,80	38,86	38,86	39,05	38,71	38,59	-	-	-	-	-	-	-	-
10	B	38,16	38,72	38,51	38,46	38,49	38,72	38,49	38,48	38,25	38,53	-	-	-	-	-	-	-	-
11	B	37,71	38,70	38,12	38,18	38,29	38,83	38,54	38,97	38,08	38,09	-	-	-	-	-	-	-	-
12	B	37,89	38,45	38,92	38,42	38,79	38,03	38,56	38,67	38,74	38,74	-	-	-	-	-	-	-	-
13	C	39,07	38,51	40,10	38,07	39,31	38,08	38,95	38,93	39,47	40,08	40,54	38,13	36,89	38,46	38,97	38,36	37,31	37,95
14	C	39,15	40,45	40,49	39,46	40,64	39,15	39,72	39,05	40,03	39,12	39,22	39,24	38,48	39,16	39,25	38,37	36,63	37,93
15	C	38,86	38,94	39,56	38,56	40,07	39,35	39,29	38,72	39,03	38,79	38,77	38,31	38,68	39,03	38,56	38,85	38,46	38,71
16	C	39,07	39,75	39,00	38,54	39,51	39,89	39,16	38,84	38,41	38,52	38,38	38,11	38,74	38,71	39,01	38,89	37,41	38,17
17	C	38,77	38,75	39,86	39,62	39,86	39,75	39,39	39,23	38,72	37,34	37,33	37,02	36,25	38,42	39,20	38,35	36,79	38,79
18	C	38,49	38,71	40,24	40,23	40,98	39,54	39,43	38,46	38,42	39,45	39,46	39,07	38,54	39,21	39,10	38,29	37,60	38,10
19	D	37,73	38,31	38,53	38,19	38,58	38,86	38,55	38,72	38,05	38,68	-	-	-	-	-	-	-	-
20	D	38,89	38,07	38,89	38,62	38,91	38,20	38,10	38,23	38,23	38,11	-	-	-	-	-	-	-	-
21	D	37,99	37,67	38,69	38,10	38,89	39,15	38,90	38,69	38,86	38,89	-	-	-	-	-	-	-	-
22	D	38,55	38,43	38,77	38,58	38,69	38,71	38,58	38,72	38,24	38,87	-	-	-	-	-	-	-	-
23	D	37,22	38,81	38,33	38,12	38,93	39,00	38,80	38,91	38,93	38,88	-	-	-	-	-	-	-	-
24	D	37,41	38,69	39,11	38,40	38,78	38,73	38,56	38,28	38,46	38,63	-	-	-	-	-	-	-	-
25	D	38,86	37,95	38,30	38,37	38,52	38,77	38,50	38,67	38,04	38,62	-	-	-	-	-	-	-	-

4.4.2. Serología

Todas las muestras de suero obtenidas antes de la inoculación con el VSRRP fueron negativas a la presencia de anticuerpos frente al VSRRP por la técnica de ELISA. También lo fueron las muestras obtenidas en los días 3 y 6 p.i., con la excepción de las procedentes de las cerdas 1 del grupo A y 10 y 12 del grupo C en el día 6. A partir del día 10 en las cerdas del grupo A y del día 15 en las cerdas del grupo C la mayoría de las muestras son positivas, con títulos de anticuerpos que oscilaron entre 1:200 y $\geq 1:1600$. Las únicas excepciones fueron la muestra de la cerda 4 del grupo A en el día 10 y de las muestras de las cerdas 7 y 8 en los días 15 y 20. Todas las cerdas de los grupos B y D permanecieron seronegativas durante todo el experimento. Los resultados se muestran en las tablas 32 y 33. El estudio serológico llevado a cabo en las soluciones de lavado empleadas para arrastrar los embriones fuera de los cuernos uterinos en las cerdas de los grupos A y B demostró que todos ellos eran negativos, con la excepción de la solución de lavado recogida de la cerda 1 del grupo A que presentaba un título de 1:200.

Resultados

Tabla 32: Presencia de anticuerpos frente al VSRRP en los sueros obtenidos de las cerdas de los grupos A y B durante el periodo de estudio.

Cerda	Grupo	Día de obtención de la muestra				
		DA	D-3	D3	D6	D10
1	A	-	-	-	+ (1:200)	+ (1:800)
2	A	-	-	-	-	+ (1:400)
3	A	-	-	-	-	+ (1:200)
4	A	-	-	-	-	-
5	A	-	-	-	-	+ (1:200)
6	A	-	-	-	-	+ (1:200)
7	B	-	-	-	-	-
8	B	-	-	-	-	-
9	B	-	-	-	-	-
10	B	-	-	-	-	-
11	B	-	-	-	-	-
12	B	-	-	-	-	-

DA: día de la adquisición de los animales.

Tabla 33: Presencia de anticuerpos frente al VSRRP en los sueros obtenidos de las cerdas de los grupos C y D durante el periodo de estudio.

Cerda	Grupo	Día de obtención de la muestra					
		DA	D-3	D3	D6	D15	D20
13	C	-	-	-	-	-	-
14	C	-	-	-	-	-	-
15	C	-	-	-	-	+ ($\geq 1:1600$)	+ (1:800)
16	C	-	-	-	+ (1:200)	+ ($\geq 1:1600$)	+ ($\geq 1:1600$)
17	C	-	-	-	-	+ (1:200)	+ (1:200)
18	C	-	-	-	+ (1:200)	+ ($\geq 1:1600$)	+ ($\geq 1:1600$)
19	D	-	-	-	-	-	-
20	D	-	-	-	-	-	-
21	D	-	-	-	-	-	-
22	D	-	-	-	-	-	-
23	D	-	-	-	-	-	-
24	D	-	-	-	-	-	-
25	D	-	-	-	-	-	-

DA: día de la adquisición de los animales.

4.4.3. Efecto de la exposición al VSRRP por las vías intranasal e intravenosa en el momento de la cubrición sobre la reproducción

Las tablas 34 y 35 muestran el número de cuerpos luteos, el número de embriones, tanto vivos como muertos, la relación embriones:cuerpos luteos y el número de embriones infectados de cada una de las cerdas de los grupos A y B y C y D respectivamente. La tabla 36 muestra los valores medios de cada uno de los parámetros anteriormente citados en cada uno de los grupos. En los grupos A y C 5 de las 6 cerdas que los componían estaban gestantes en el momento del sacrificio, en el día 10 p.i., mientras que en los grupos de las cerdas testigos, sólo 3 de las 6 cerdas del grupo B y todas las cerdas del grupo D lo estaban. Sin embargo, la presencia de cuerpos luteos en los ovarios de las cerdas vacías de los grupos A y B y de *corpora albicans* y folículos en desarrollo en las de los grupos C y D indican que las cerdas habían ovulado y, en el caso de los dos últimos grupos, iban a volver a salir a celo en la fecha prevista. Aunque considerando grupo por grupo la tasa de concepción de las cerdas del grupo B fue menor que la del resto de los grupos, si se consideran en conjunto los grupos de las cerdas infectadas y los grupos de las cerdas testigos las tasas de concepción en ambos grupos (83,3% y 75% respectivamente) no presentaron diferencias significativas.

Aunque existieron marcadas diferencias individuales en el número de cuerpos luteos presentes en los ovarios, el número de embriones y la relación embriones:cuerpos luteos entre las cerdas de todos los grupos en estudio (tablas 34 y 35), los valores medios de los tres parámetros fueron similares en todos los grupos (tabla 36), sin que existieran diferencias estadísticamente significativas entre ellos. Sin embargo, hay que destacar que el número de embriones recuperados de las cerdas sacrificadas en el día 10 p.i. (grupos A y B) fue menor del que cabría esperar en función del número de cuerpos luteos presentes en los ovarios (tabla 34).

El análisis del número de embriones muertos o degenerando considerando los valores medios obtenidos en las cerdas inoculadas con el VSRRP y en las cerdas testigos demostró que las diferencias entre ambos grupos eran estadísticamente significativas ($p < 0,01$). Sin embargo si se valoran por separado los datos obtenidos de las cerdas sacrificadas en el día 10 y los obtenidos de las cerdas sacrificadas en el día 20 p.i. hay que destacar que, mientras en el día 20 p.i. el número de embriones muertos en el grupo C es 3 veces mayor que en el grupo D, siendo la diferencia estadísticamente significativa ($p < 0,001$), en el día 10 p.i. ocurre lo contrario, es decir, aparece un número mayor de embriones degenerados en el grupo B, siendo esta diferencia también estadísticamente significativa ($p < 0,05$), aunque de menor magnitud que la existente entre las cerdas de los grupos C y D.

Resultados

Si se tiene en cuenta el número de camadas infectadas cabe destacar que, mientras que no fue posible detectar ningún embrión infectado en ninguna de las camadas de las cerdas del grupo A, 3 de las 5 camadas procedentes de las cerdas del grupo C estaban infectadas, con un porcentaje medio de embriones infectados del 16%.

Los embriones de las cerdas del grupo C de los cuales fue posible aislar el VSRRP, alcanzando el título vírico, expresado en $DI_{50}CT/g$ de tejido, que figura a su lado entre paréntesis, fueron los embriones que ocupaban las posiciones quinta (log 2,32), sexta (log 2,5), novena (log 2,5) y décimo primera (log 2,5) del cuerno uterino izquierdo y cuarta (log 2) y octava (log 2,66) del cuerno uterino derecho de la cerda 15, el embrión que ocupaba la posición quinta en el cuerno uterino izquierdo de la cerda 17 (log 3,5) y los embriones que ocupaban las posiciones décimo sexta del cuerno uterino izquierdo (log 3) y tercera (log 2,5), cuarta (log 2,5), quinta (log 3,41), décimo primera (log 2,5), décimo segunda (log 3,41), décimo tercera (log 2,41), vigésimo segunda (log 3,5) y vigésimo tercera (log 2,5) del cuerno uterino derecho de la cerda 18. Ninguno de los líquidos atlantoideos estudiados fue positivo a la presencia del VSRRP con la única excepción del correspondiente al embrión que ocupaba la posición sexta en el cuerno uterino izquierdo de la cerda 18, con un título vírico de tan solo log 1,5 $DI_{50}CT/mL$. No fue posible aislar el VSRRP de ninguno de los embriones de las cerdas del grupo D, como tampoco de las muestras de líquidos atlantoideos de los embriones de estas cerdas.

En los embriones de las cerdas del grupo A no fue posible aislar el VSRRP, sin que fuera tampoco posible encontrarlo en ninguno de las soluciones de lavado utilizadas para arrastrar los embriones fuera de los cuernos uterinos.

Tabla 34: Número de cuerpos luteos y de embriones, tanto vivos como muertos, encontrados en la necropsia, a los 10 días p.i., de las cerdas de los grupos A y B, así como la relación embriones:cuerpos luteos.

Nº de la cerda	Grupo	Cuerno uterino izquierdo			Cuerno uterino derecho			Total			
		N.C.L.	Nº Emb. vivos	Nº Emb. muertos	N.C.L.	Nº Emb. vivos	Nº Emb. muertos	N.C.L.	Nº Emb. vivos	Nº Emb. muertos	R.Emb:CL
1	A	5	0	0	10	0	0	15	0	0	0
2	A	10	2	0	9	3	3	19	5	3	0,42
3	A	17	15	*	22	12	1	39	27	1	0,72
4	A	7	9	0	10	7	0	17	16	0	0,94
5	A	17	5	3 *	17	14	3 *	34	19	6 *	0,74
6	A	5	0	1	4	0	3	9	0	4	0,44
7	B	12	5	3	9	7	0	21	12	3	0,71
8	B	15	8	0	21	4	5	36	12	5	0,47
9	B	20	0	0	18	0	0	38	0	0	0
10	B	11	0	0	14	0	0	25	0	0	0
11	B	8	0	0	4	0	0	12	0	0	0
12	B	15	6	11	11	8	1	26	14	12	1

N.C.L.: número de cuerpos luteos; Nº Emb. vivos: número de embriones vivos; Nº Emb. muertos: número de embriones muertos; R.Emb:CL: relación embriones / cuerpos luteos.

*: En los lavados de estos cuernos uterinos aparecieron restos de embriones, bien sea restos de membranas o células sueltas, sin que fuera posible determinar el número exacto de embriones a los que correspondían.

Tabla 35: Número de cuerpos luteos y embriones, tanto vivos como muertos, así como el número de embriones infectados por el VSRRP y la relación embriones:cuerpos luteos encontrados en la necropsia, a los 20 días p.i., de las cerdas de los grupos C y D.

Nº de la cerda	Grupo	Cuerno uterino izquierdo					Cuerno uterino derecho					Total					
		N.C.L.	N.E.V.	N.E.V.I.	N.E.M.	N.E.M.I.	N.C.L.	N.E.V.	N.E.V.I.	N.E.M.	N.E.M.I.	N.C.L.	N.E.V.	N.E.V.I.	N.E.M.	N.E.M.I.	R.C.L.:E.
13	C	10	8	0	0	0	5	5	0	2	0	15	13	0	2	0	1
14	C	10*	0	0	0	0	15*	0	0	0	0	25*	0	0	0	0	0
15	C	12	7	3	5	1	10	5	0	5	2	22	12	3	10	3	1
16	C	8	5	0	0	0	8	5	0	0	0	16	10	0	0	0	0,63
17	C	15	3	1	2	0	12	8	0	0	0	27	11	1	2	0	0,48
18	C	23	7	1	9	0	19	11	4	12	4	42	18	5	21	4	0,93
19	D	12	8	0	2	0	14	12	0	1	0	26	20	0	3	0	0,88
20	D	10	8	0	0	0	5	7	0	0	0	15	15	0	0	0	1
21	D	15	9	0	4	0	14	11	0	0	0	29	20	0	4	0	0,83
22	D	4	4	0	0	0	12	5	0	0	0	16	9	0	0	0	0,56
23	D	8	6	0	0	0	12	11	0	0	0	20	17	0	0	0	0,85
24	D	10	1	0	1	0	10	4	0	0	0	20	5	0	1	0	0,30
25	D	9	9	0	1	0	9	6	0	2	0	18	15	0	3	0	1

N.C.L.: número de cuerpos luteos; N.E.V.: número de embriones vivos; N.E.V.I.: número de embriones vivos infectados; N.E.M.: número de embriones muertos; N.E.M.I.: número de embriones muertos infectados; R.C.L.:E.: relación cuerpos luteos:embriones.

Las cifras de las columnas C.L. que van acompañadas de * son *corpora albicans*.

Tabla 36: Valores medios del número de cuerpos luteos, número de embriones, tanto vivos como muertos, número de embriones infectados y la relación embriones:cuerpos luteos obtenidos en cada uno de los grupos en estudio.

	Cerdas sacrificadas en el día 10		Cerdas sacrificadas en el día 20		Valores totales	
	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupos A y C	Grupos B y D
Nº de cerdas gestantes	5	3	5	7	10	10
Nº de cerdas vacías	1	3	1	0	2	3
Nº de camadas infectadas	0	0	3	0	3	0
Porcentaje de camadas infectadas	0	0	60	0	30	0
Nº total de cuerpos luteos (rango)	118 (9-39)	83 (12-38)	122 (15-42)	144 (15-29)	240 (9-42)	227 (12-38)
Nº total de embriones (rango)	81 (4-28)	58 (15-26)	99 (10-39)	112 (6-24)	180 (4-39)	170 (6-26)
Nº de embriones / Nº de cuerpos luteos	0,69	0,70	0,81	0,78	0,75	0,75
Nº de embriones normales (%)	67 (82,7)	38 (65,5)	64 (64,6)	101 (90,2)	131 (72,8)	139 (81,8)
Nº de embriones normales infectados (%)	0 (0)	0 (0)	9 (14)	0 (0)	9 (6,9)	0 (0)
Nº de embriones muertos o degenerando(%)	14 (17,3)	20 (34,5)	35 (35,4)	11 (9,8)	49 (27,2)	31 (18,2)
Nº de embriones muertos infectados	0 (0)	0 (0)	7 (20)	0 (0)	7 (14,3)	0 (0)
Nº de embriones infectados / Nº total de embriones	0	0	0,16	0	0,09	0

4.4.4. Detección del VSRRP en las distintas muestras recogidas de los animales en estudio

Todas las muestras de suero recogidas antes de la exposición al VSRRP fueron negativas al aislamiento vírico en cultivos de MAP. Sin embargo, la mayoría de las muestras recogidas en los días 3 y 6 en las cerdas de los grupos A y C fueron positivas, con títulos víricos que oscilaron entre $<\log 1$ y $\log 5,38 \text{ DI}_{50}\text{CT/mL}$. En el día 10 sólo 3 de las 6 cerdas pertenecientes al grupo A fueron positivas, con títulos víricos bajos y en los días 15 y 20 la mayoría de las cerdas del grupo C fueron negativas, exceptuando las cerdas 13 y 18 en el día 15. Todas las muestras procedentes de las cerdas de los grupos B y D fueron negativas. Los resultados se muestran en las tablas 37 y 38.

Todos los hisopos nasales recogidos en las cerdas de los grupos A y C antes de la inoculación con el VSRRP fueron negativos cuando se llevó a cabo el aislamiento del virus. Después de la inoculación con el virus sólo dos de los hisopos tomados en el día 3 fueron positivos en el aislamiento, con títulos víricos próximos a $\log 2 \text{ DI}_{50}\text{CT/mL}$. Todas las muestras procedentes de las cerdas de los grupos B y D tomadas a lo largo del experimento fueron negativas. Los resultados se muestran en las tablas 37 y 38.

En los órganos procedentes del aparato reproductor el VSRRP fue aislado de 7 de los 12 ovarios de las cerdas del grupo A y de 1 de los ovarios de las cerdas del grupo C, así como de 2 de los úteros de las cerdas del grupo A y 1 de los úteros de las cerdas del grupo C. Los títulos víricos obtenidos en estas muestras fueron del orden de $\log 2 \text{ DI}_{50}\text{CT/g}$ de tejido o menores. De la misma manera fue posible aislar el virus en 4 de los 5 ganglios uterinos recogidos en las cerdas del grupo A y de 3 de los 8 recogidos en las cerdas del grupo C, con títulos víricos similares a los obtenidos en las muestras de ovarios y úteros. Todas las muestras procedentes de las cerdas de los grupos B y D fueron negativas.

En el resto de los órganos recogidos en la necropsia, el VSRRP se aisló de 5 de las 6 amígdalas procedentes de las cerdas del grupo A y de los 6 pulmones de las cerdas de este grupo. Los títulos víricos obtenidos en las muestras positivas oscilaron entre $\log 2,5$ y $\log 4,32 \text{ DI}_{50}\text{CT/g}$ de tejido. En el grupo C el VSRRP se aisló de 4 de las 6 amígdalas, de los 6 pulmones, de 4 de los 5 ganglios inguinales superficiales y de los 6 ganglios submandibulares recogidos. En este grupo los títulos víricos que presentaron las muestras positivas oscilaron entre títulos $<\log 2$ y $\log 4,80 \text{ DI}_{50}\text{CT/g}$ de tejido. Todas las muestras procedentes de las cerdas de los grupos B y D fueron negativas al intento de aislamiento del VSRRP. Los resultados se muestran en la tabla 39.

Resultados

Tabla 37: Resultados del aislamiento del VSRRP a partir de las muestras de suero y los hisopos nasales obtenidos de las cerdas de los grupos A y B a lo largo del periodo de estudio.

Nº de la cerda	Grupo	Muestras de suero				Hisopos nasales			
		D-3	D3	D6	D10	D-3	D3	D6	D10
1	A	-	+ (2,30)	+ (4,20)	-	-	-	-	-
2	A	-	+ (2,88)	+ (3,11)	-	-	-	-	-
3	A	-	+ (2,50)	+ (<1)	+ (<1)	-	-	-	-
4	A	-	+ (2,50)	+ (1)	+ (<1)	-	-	-	-
5	A	-	+ (3,23)	+ (1,32)	-	-	-	-	-
6	A	-	+ (2,70)	+ (2,41)	+ (2,75)	-	-	-	-
7	B	-	-	-	-	-	-	-	-
8	B	-	-	-	-	-	-	-	-
9	B	-	-	-	-	-	-	-	-
10	B	-	-	-	-	-	-	-	-
11	B	-	-	-	-	-	-	-	-
12	B	-	-	-	-	-	-	-	-

D-3: día 3 antes de la inoculación con el VSRRP; D3, D6, D10: días 3, 6 y 10 después de la inoculación con el VSRRP. Los títulos víricos están calculados como $DI_{50}CT/mL$ y están expresados en la forma de $\log X$, siendo X el número que aparece entre paréntesis.

Tabla 38: Resultados del aislamiento del VSRRP a partir de las muestras de suero y de los hisopos nasales obtenidos de las cerdas de los grupos C y D a lo largo del periodo de estudio.

Nº de la cerda	Grupo	Muestras de sueros					Hisopos nasales				
		D-3	D3	D6	D15	D20	D-3	D3	D6	D15	D20
13	C	-	+ (4,48)	+ (2)	+ (2)	-	-	-	-	-	-
14	C	-	+ (4,80)	-	-	-	-	+ (2,50)	-	-	-
15	C	-	+ (4,71)	-	-	-	-	+ (2)	-	-	-
16	C	-	+ (5,38)	+ (<1)	-	-	-	-	-	-	-
17	C	-	+ (3,32)	+ (4,57)	-	-	-	-	-	-	-
18	C	-	+ (4,41)	+ (4,50)	+ (4,57)	-	-	-	-	-	-
19	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
23	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

D-3: día 3 antes de la inoculación con el VSRRP; D3, D6, D15, D20: días 3, 6, 15 y 20 después de la inoculación con el VSRRP. Los títulos víricos están calculados como $DI_{50}CT/mL$ y están expresados en la forma de $\log X$, siendo X el número que aparece entre paréntesis.

Resultados

Tabla 39: Resultados del aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP a partir de las muestras de distintos órganos recogidos en la necropsia de las cerdas de los grupos A, B, C y D.

Cerda	Grupo	Órganos del aparato reproductor					Otros órganos			
		Ov.I.	Ov.D.	Útero	G.L.U.I.	G.L.U.D.	Amig.	Pulmón	G.L.I.S.I.	G.L.S.I.
1	A	+	+	+	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø
		(2,41)	(2,70)	(2)			(3,32)	(4,32)		
2	A	-	-	-	Ø	+	+	+	Ø	Ø
						(2,58)	(2,70)	(3,32)		
3	A	+	+	-	Ø	Ø	+	+	Ø	Ø
		(<2)	(<2)				(2,50)	(2,58)		
4	A	+	-	-	+	Ø	+	+	Ø	Ø
		(<2)			(2,50)		(2,70)	(2,70)		
5	A	-	-	-	-	Ø	+	+	Ø	Ø
							(2,50)	(3,11)		
6	A	+	+	+	+	+	-	+	Ø	Ø
		(2,58)	(2,41)	(2,49)	(2,50)	(2,5)		(2,67)		
7	B	-	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø
8	B	-	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø
9	B	-	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø
10	B	-	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø
11	B	-	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø
12	B	-	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø
13	C	-	-	-	Ø	-	+	+	+	+
							(3)	(3,59)	(3,20)	(3,49)
14	C	+	-	-	Ø	Ø	+	+	+	+
		(<2)					(2,57)	(4,50)	(2)	(2,57)
15	C	-	-	-	-	-	-	+	-	+
								(3,71)		(2,50)
16	C	-	-	-	Ø	-	-	+	Ø	+
								(4,15)		(2)
17	C	-	-	-	+	+	+	+	+	+
					(2,66)	(3,49)	(3,89)	(4,80)	(3,50)	(4,80)
18	C	-	-	-	+	-	+	+	+	+
					(<2)		(2,66)	(2,74)	(<2)	(2)
19	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
20	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
21	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
22	D	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-
23	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	D	-	-	-	Ø	Ø	-	-	-	-
25	D	-	-	-	Ø	-	-	-	-	-

Ov.I.: ovario izquierdo; Ov.D.: ovario derecho; G.L.U.I.: ganglio linfático uterino izquierdo; G.L.U.D.: ganglio linfático uterino derecho; Amig.: amígdala; G.L.I.S.I.: ganglio linfático inguinal superficial izquierdo; G.L.S.I.: ganglio linfático submandibular izquierdo; Ø: muestra no recogida. Los títulos víricos están calculados como $DI_{50}CT/g$ de tejido y están expresados en la forma de log X, siendo X el número que aparece entre paréntesis.

4.5. Estudio del efecto de la exposición de cerdas al VSRRP en los días 7, 14 ó 21 de gestación: sintomatología asociada a la infección, efecto sobre el desarrollo embrionario y susceptibilidad de los embriones a la infección por el virus (objetivos B.1, B.3 y B.4)

4.5.1. Signos clínicos

La inoculación de las cerdas de los grupos A, C y E con el VSRRP, en los días 7, 14 y 21 de gestación respectivamente, no dio lugar a la aparición de ningún síntoma respiratorio en ninguno de los animales en estudio. Tampoco se observaron signos de anorexia o inapetencia con la excepción de las cerdas 9 y 13, ambas del grupo C que mostraron anorexia y decaimiento en el día 2 p.i.. Las cerdas de los grupos B, D y F permanecieron normales a todo lo largo del experimento.

No se observaron aumentos en las temperaturas rectales de las cerdas pertenecientes a los grupos A, C y E, salvo en el caso de la cerda 22, perteneciente al grupo E, en el día 1 y 3 p.i., con temperaturas de 39,8°C y la cerda 19, también del grupo E, que presentó temperaturas febriles durante varios días tras la inoculación que oscilaron entre 39,7°C y 40,4°C. Las temperaturas de las cerdas de los grupos A y B (cerdas inoculadas en el día 7 de gestación y sus testigos) se muestran en la tabla 40, las de los grupos C y D (cerdas inoculadas en el día 14 de gestación y sus testigos) en la tabla 41 y las de los grupos E y F (cerdas inoculadas en el día 21 de gestación y sus testigos) en la tabla 42.

4.5.2. Serología

Los estudios de anticuerpos llevados a cabo, utilizando tanto la técnica de IPMA como la de ELISA, dieron como resultado que todas las muestras de suero de las cerdas de todos los grupos obtenidas antes de la inoculación experimental con el VSRRP fueron negativas por ambas técnicas. Después de la inoculación, todas las cerdas de los grupos A, C y E habían seroconvertido en el día 21 p.i., presentando títulos de anticuerpos que oscilaron entre 1:100 y 1:800 por la técnica de IPMA y entre 1:200 y 1:800 por la técnica de ELISA. Previamente, en los días 5 y 7 p.i., 3 de las cerdas del grupo E (20, 21 y 22) y una de las cerdas del grupo A (3) fueron positivas, al menos por una de las dos técnicas empleadas, con títulos de anticuerpos que oscilaron entre 1:50 y 1:1800 por la técnica de IPMA y entre 1:200 y 1:800 por la técnica de ELISA. Sólo existieron discrepancias en los resultados obtenidos con las dos técnicas en el caso de las cerdas 20 y 21 en el día 5 p.i. las cuales fueron positivas, con un título de anticuerpos de 1:200 por la técnica de IPMA y negativas por la técnica de ELISA y en el caso de las cerdas 3 y

Resultados

22 en el día 7 p.i. y en la cerda 3 en el día 5 p.i. que fueron positivas por la técnica de ELISA, con títulos de anticuerpos de entre 1:200 y 1:800 y negativas por la técnica de IPMA. Los resultados se muestran en la tabla 43.

Tabla 40: Temperaturas rectales de las cerdas de los grupos A y B desde el día de la inseminación artificial hasta 21 días después de la inoculación con el VSRRP.

Día	Grupo A					Grupo B		
	Nº1	Nº2	Nº3	Nº4	Nº5	Nº6	Nº7	Nº8
-7	38,6	38,7	38,6	38,6	38,8	38,5	38,3	38,8
-6	38,1	37,9	38,2	38,4	38,2	38,5	38,5	39,0
-5	38,7	38,7	38,5	37,8	38,5	38,5	38,2	38,6
-4	38,9	38,1	38,6	38,5	38,1	38,7	38,0	38,7
-3	38,6	38,1	38,6	39,0	38,1	38,4	38,9	37,9
-2	38,5	38,5	38,4	39,1	38,3	38,2	38,4	37,9
-1	38,1	38,2	38,6	38,5	37,6	38,4	38,5	38,6
0	38,8	38,8	38,8	38,6	38,7	37,4	38,0	37,9
1	38,1	38,3	38,5	38,4	38,3	38,8	38,8	38,2
2	38,3	38,4	38,8	38,4	37,8	38,2	38,2	38,0
3	39,1	39,2	39,2	38,9	39,3	38,8	38,0	38,1
4	38,1	39,0	39,3	38,2	39,1	37,9	37,8	37,9
5	38,7	39,0	38,8	38,6	38,7	37,4	38,2	38,6
6	38,7	38,6	38,9	38,4	38,5	38,3	38,2	38,7
7	38,8	39,2	39,0	38,6	38,7	37,6	38,1	37,4
8	38,5	38,3	38,6	38,7	38,1	37,8	38,0	36,7
9	38,5	38,1	38,0	38,7	36,9	38,2	37,7	37,5
10	37,9	38,3	37,9	36,4	38,8	37,5	36,9	36,8
11	38,1	37,4	38,3	38,3	38,2	38,6	37,9	38,4
12	38,4	37,6	38,5	38,4	38,0	38,1	38,0	38,1
13	38,6	38,4	38,8	38,4	37,7	38,2	37,8	38,1
14	38,5	38,3	38,5	38,1	39,2	38,7	36,1	37,9
15	38,6	38,4	38,3	38,5	38,8	37,5	37,0	38,1
16	38,6	38,7	38,6	38,3	37,8	37,0	37,6	38,1
17	38,4	38,5	38,4	38,2	38,0	38,4	38,3	38,4
18	38,4	38,1	38,3	38,1	37,9	38,3	38,0	37,9
19	38,3	38,0	38,6	38,5	38,1	39,0	38,6	38,6
20	37,9	38,1	38,4	38,2	38,3	38,8	38,0	37,9
21	37,9	38,3	38,0	37,8	38,0	38,8	38,0	37,9

Resultados

Tabla 41: Temperaturas rectales de las cerdas de los grupos C y D desde el día de la inseminación artificial hasta 21 días después de la inoculación con el VSRRP.

Día	Grupo C						Grupo D		
	Nº9	Nº10	Nº11	Nº12	Nº13	Nº14	Nº15	Nº16	Nº17
-14	38,6	38,6	38,8	38,7	38,3	38,8	39,0	38,8	39,0
-13	38,2	38,5	38,8	38,7	38,3	38,8	39,2	38,8	39,2
-12	38,3	38,3	37,9	38,5	38,6	37,9	38,8	38,9	38,9
-11	38,6	38,5	38,7	38,5	37,5	38,2	38,0	38,2	38,0
-10	37,6	38,4	38,2	38,4	37,9	37,7	39,0	39,0	38,5
-9	38,4	38,3	37,8	38,5	38,3	38,2	39,2	38,1	38,2
-8	38,0	37,9	38,1	38,0	37,0	38,0	38,2	38,1	38,1
-7	38,1	38,1	38,6	38,6	38,1	38,5	38,1	37,8	36,8
-6	38,3	38,0	38,6	38,0	38,2	38,2	38,9	38,8	38,7
-5	38,4	38,6	38,5	37,8	38,6	38,5	38,0	38,1	38,0
-4	38,3	38,5	38,5	38,1	38,1	37,9	37,8	38,2	38,8
-3	37,4	38,3	38,3	37,5	38,2	37,8	37,2	37,6	37,8
-2	38,2	38,7	38,0	37,3	38,2	37,8	36,9	38,2	38,7
-1	38,0	38,0	38,4	38,2	38,4	38,3	38,3	38,0	38,6
0	38,2	38,3	38,0	37,9	38,5	38,1	37,5	38,2	38,6
1	37,8	38,8	38,0	38,3	38,2	38,1	38,4	38,1	37,8
2	37,5	38,5	37,0	37,5	37,4	37,2	38,0	37,8	38,0
3	38,9	38,2	38,9	36,3	38,9	37,2	37,8	36,5	37,5
4	37,6	37,6	39,0	38,0	38,3	36,7	38,3	37,9	37,6
5	38,2	38,5	39,0	38,0	39,0	38,1	38,2	38,1	37,8
6	37,9	38,2	38,8	37,9	38,3	38,0	38,3	38,2	38,1
7	38,6	38,7	39,1	38,5	38,3	38,7	37,8	37,1	37,4
8	38,0	38,6	38,8	38,4	38,4	38,3	37,8	38,2	38,0
9	38,5	38,3	38,0	38,4	38,5	38,4	38,1	38,3	38,1
10	37,8	38,7	38,4	38,3	39,0	38,4	38,6	38,5	38,4
11	38,1	38,4	38,5	38,0	39,0	38,1	37,6	37,4	38,1
12	38,5	38,1	38,9	37,7	37,8	37,7	38,2	38,6	38,0
13	37,7	38,6	38,6	38,5	37,8	38,0	38,3	38,2	37,5
14	38,2	37,9	38,6	36,5	37,6	37,8	38,3	38,2	37,5
15	37,4	38,4	38,6	36,9	38,1	36,6	38,3	38,2	37,5
16	38,4	38,2	38,7	38,3	38,2	38,3	38,2	38,2	38,1
17	37,8	37,8	38,3	37,6	38,0	38,0	38,3	38,1	38,3
18	38,3	37,5	37,9	37,0	37,1	38,0	38,2	38,1	38,2
19	38,4	38,3	37,8	38,5	38,5	38,5	38,0	38,3	38,1
20	38,2	38,2	38,0	38,3	38,5	37,1	38,2	37,4	37,9
21	38,6	37,9	38,3	37,9	37,9	37,7	38,6	38,3	38,6

Resultados

Tabla 42: Temperaturas rectales de las cerdas de los grupos E y F desde el día de la inseminación artificial hasta 21 días después de la inoculación con el VSRRP.

Día	Grupo E					Grupo F		
	Nº18	Nº19	Nº20	Nº21	Nº22	Nº23	Nº24	Nº25
-21	38,0	38,9	38,6	38,4	38,4	38,8	38,6	38,4
-20	37,9	38,9	37,7	38,4	37,9	38,7	38,7	38,6
-19	37,8	38,6	38,5	37,6	38,7	38,9	38,6	38,5
-18	38,3	38,6	38,5	38,2	38,0	38,9	38,3	38,2
-17	37,8	38,6	38,7	37,7	38,5	38,8	38,7	38,5
-16	38,2	38,6	38,8	38,3	38,8	39,1	38,0	38,1
-15	38,0	38,0	38,1	37,9	38,2	39,3	38,0	38,0
-14	38,1	38,7	38,3	38,2	38,2	38,3	38,0	38,1
-13	38,1	38,5	38,4	38,0	38,3	38,4	38,2	38,7
-12	38,5	38,5	38,5	37,4	37,1	38,4	37,8	37,9
-11	37,8	38,7	38,4	37,3	38,2	38,8	37,1	38,0
-10	38,0	38,5	37,7	36,8	36,0	38,0	37,8	36,7
-9	38,2	38,6	37,3	38,2	36,4	37,6	38,2	38,0
-8	38,2	38,5	37,5	37,7	37,0	38,5	38,1	38,4
-7	38,1	38,8	39,2	37,7	38,2	38,6	37,1	38,5
-6	37,5	38,6	37,8	37,4	38,6	38,8	38,1	38,0
-5	37,6	38,5	38,0	37,6	38,6	38,3	37,8	38,5
-4	36,6	37,9	38,3	37,9	37,9	37,9	38,0	37,8
-3	37,1	38,2	37,8	36,4	38,5	37,6	38,0	37,6
-2	37,1	37,8	39,1	38,8	38,8	38,6	37,7	38,2
-1	37,5	38,2	38,7	37,9	38,8	38,8	38,2	38,4
0	37,6	38,2	39,1	38,5	38,2	38,8	37,7	38,3
1	37,8	40,0	38,9	38,1	39,8	39,1	37,3	37,8
2	37,6	38,5	38,7	38,5	38,7	39,2	37,9	37,8
3	38,2	39,7	38,6	38,2	39,8	39,0	38,7	38,3
4	37,6	40,0	38,4	38,0	38,4	38,8	38,0	37,3
5	37,9	38,8	39,0	38,4	38,8	38,4	38,9	38,2
6	37,8	39,9	38,5	37,9	38,6	39,2	37,9	37,5
7	37,5	40,4	37,5	37,8	37,9	39,2	37,9	37,5
8	36,2	39,6	38,6	37,7	37,9	39,2	37,9	37,5
9	37,9	39,8	38,7	38,3	38,4	38,6	38,2	38,1
10	37,4	39,8	37,8	38,3	38,0	38,8	38,3	37,8
11	37,2	39,5	38,1	38,3	37,4	38,4	38,1	38,1
12	37,5	39,0	38,4	38,4	38,3	38,4	38,0	38,5
13	37,4	39,0	37,7	38,2	36,9	38,7	37,8	38,1
14	37,4	40,2	37,6	38,4	38,2	38,9	38,3	38,1
15	37,5	39,3	37,2	38,0	37,3	38,0	37,3	37,5
16	37,7	39,2	37,8	38,3	38,2	38,6	37,9	37,6
17	37,9	38,7	37,9	38,3	38,7	39,0	38,1	37,2
18	38,0	38,7	38,6	38,6	38,4	38,5	37,7	37,4
19	37,4	38,3	38,5	38,2	38,6	38,8	37,5	37,6
20	37,6	38,9	38,6	38,1	38,5	38,9	37,9	37,6
21	38,4	38,9	38,5	38,1	38,7	38,6	36,7	37,9

Resultados

Tabla 43: Resultados de los estudios de determinación de anticuerpos frente al VSRRP por las técnicas de IPMA y ELISA en las cerdas de todos los grupos a lo largo del experimento.

Nº de la cerda	Grupo	DA		D-3		D5		D7		D21	
		IPMA	ELISA	IPMA	ELISA	IPMA	ELISA	IPMA	ELISA	IPMA	ELISA
1	A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
										(1:200)	(1:400)
2	A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
										(1:100)	(1:400)
3	A	-	-	-	-	-	+	-	+	+	+
							(1:200)		(1:800)	(1:100)	(1:400)
4	A	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
										(1:400)	(1:400)
5	5	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
										(1:400)	(1:800)
6	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
7	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
8	B	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
9	C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
										(1:400)	(1:200)
10	C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
										(1:100)	(1:400)
11	C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
										(1:200)	(1:400)
12	C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
										(1:100)	(1:200)
13	C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
										(1:100)	(1:800)
14	C	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
										(1:200)	(1:800)
15	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
17	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	E	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
										(1:800)	(1:400)
19	E	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
										(1:400)	(1:400)
20	E	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
						(1:200)		(1:800)	(1:200)	(1:200)	(1:400)
21	E	-	-	-	-	+	-	+	+	+	+
						(1:200)		(1:50)	(1:200)	(1:200)	(1:200)
22	E	-	-	-	-	-	-	-	+	+	+
									(1:200)	(1:200)	(1:400)
23	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
24	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

DA: día de la adquisición de los animales; D-3: 3 días antes de la inoculación experimental con el VSRRP; D5, D7 y D21: días 5, 7 y 21 después de la inoculación experimental con el VSRRP.

4.5.3. Efecto de la exposición al VSRRP por la vía intranasal en los días 7, 14 ó 21 de gestación sobre la reproducción

El número de cuerpos luteos, así como el de embriones, tanto vivos y muertos como infectados por el VSRRP, y la relación embriones:cuerpos luteos obtenidos en cada una de las cerdas en estudio figuran en la tabla 44. La tabla 45 muestra los valores medios de estos mismos parámetros en cada uno de los grupos de tratamiento. Aunque existieron grandes diferencias individuales en el número de cuerpos luteos y embriones y, por tanto, en la relación embriones:cuerpos luteos (tabla 44), cuando se consideran en su conjunto estos valores se observa que todos ellos fueron superiores en los grupos de cerdas inoculados con el VSRRP que en sus testigos, con la excepción de los grupos E y F donde los testigos (grupo F) tuvieron un mayor número de embriones y una relación embriones:cuerpos luteos también superior. Sin embargo, el estudio estadístico llevado a cabo demostró que las diferencias no eran significativas. Cabe destacar que la cerda número 19, perteneciente al grupo E, aunque había mostrado signos externos de celo, no sólo no estaba gestante en el momento del sacrificio, si no que además mostraba un infantilismo genital, sin que existieran en los ovarios cuerpos luteos ni *corpora albicans*. El estudio del número de embriones muertos demostró que su número, considerando los valores medios de todos los animales, era aproximadamente el doble en los grupos de las cerdas inoculadas con el VSRRP que en los grupos de las cerdas testigos (1,6 frente a 0,85 embriones muertos/cerda respectivamente). Considerando cada uno de los grupos de cerdas inoculadas con el VSRRP frente a sus testigos este fenómeno se repite en los animales inoculados en los días 7 y 14 de gestación pero no en los inoculados en el día 21, donde existe un mayor número de embriones muertos en las cerdas testigos. Cuando se estudian los animales de forma individual se puede observar un porcentaje mayor de embriones muertos en la cerda número 13, perteneciente al grupo C que tuvo 10 embriones muertos (lo que representa un 52,6% de su camada) y la cerda número 9, también del grupo C, la cual, aunque sólo tuvo 2 embriones muertos, éstos representan el 33,3% de su camada. El estudio estadístico llevado a cabo reveló que estas diferencias no eran significativas. Sólo 2 de las 11 camadas de las cerdas inoculadas con el VSRRP tenían al menos uno de sus embriones infectados en el momento del sacrificio. Ambas camadas pertenecían al grupo C (cerdas inoculadas con el VSRRP en el día 14 de gestación). Los embriones de los cuales se pudo aislar el VSRRP en cultivos de MAP, confirmándose este resultado positivo por la prueba de RT-PCR fueron el embrión que ocupaba la posición cuarta del cuerno uterino izquierdo de la cerda número 10 y los embriones que ocupaban las posiciones 2º, 3º y 4º del cuerno uterino derecho de la cerda número 13. Todos los líquidos atlantoideos estudiados fueron negativos con la excepción del líquido atlantoideo del embrión que ocupaba la posición cuarta del cuerno uterino derecho de la cerda número 13, el cual también fue positivo. Todos los embriones y los líquidos atlantoideos de las cerdas de los grupos B, D y E (cerdas testigos) fueron negativos al VSRRP.

Tabla 44: Número de cuerpos luteos y embriones, tanto vivos como muertos, así como el número de embriones infectados por el VSRRP y la relación embriones:cuerpos luteos encontrados en la necropsia de todas las cerdas en estudio.

Nº de la cerda	Grupo	Cuerno uterino izquierdo					Cuerno uterino derecho					Total					R.E.:C.L.
		N.C.L.	N.E.V.	N.E.V.I.	N.E.M.	N.E.M.I.	N.C.L.	N.E.V.	N.E.V.I.	N.E.M.	N.E.M.I.	N.C.L.	N.E.V.	N.E.V.I.	N.E.M.	N.E.M.I.	
1	A	13	10	0	0	0	8	8	0	1	0	21	18	0	1	0	0,90
2	A	12	11	0	1	0	13	9	0	1	0	25	20	0	2	0	0,88
3	A	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
4	A	11	10	0	0	0	9	6	0	0	0	20	16	0	0	0	0,80
5	A	15	7	0	1	0	10	7	0	1	0	25	14	0	2	0	0,64
6	B	5	0	0	0	0	9	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0
7	B	5	9	0	0	0	12	8	0	0	0	17	17	0	0	0	1
8	B	12	2	0	0	0	4	3	0	0	0	16	5	0	0	0	0,31
9	C	11	1	0	1	0	4	3	0	1	0	15	4	0	2	0	0,40
10	C	14	7	1	1	0	3	6	0	0	0	17	13	1	1	0	0,82
11	C	6	0	0	0	0	8	0	0	0	0	14	0	0	0	0	0
12	C	8	3	0	0	0	13	4	0	0	0	21	7	0	0	0	0,33
13	C	9	3	0	6	0	10	6	3	4	0	19	9	3	10	0	1
14	C	10	8	0	0	0	8	9	0	0	0	18	17	0	0	0	0,94
15	D	8	6	0	0	0	7	3	0	1	0	15	9	0	1	0	0,66
16	D	9	4	0	0	0	5	5	0	0	0	14	9	0	0	0	0,64
17	D	11	1	0	0	0	8	2	0	1	0	19	3	0	1	0	0,21
18	E	16	5	0	0	0	20	1	0	0	0	36	6	0	0	0	0,16
19	E	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
20	E	7	0	0	0	0	3	0	0	0	0	10	0	0	0	0	0
21	E	11	4	0	0	0	4	3	0	0	0	15	7	0	0	0	0,46
22	E	10	0	0	0	0	13	0	0	0	0	23	0	0	0	0	0
23	F	7	0	0	0	0	9	0	0	0	0	16	0	0	0	0	0
24	F	6	3	0	2	0	13	5	0	0	0	19	8	0	2	0	0,53
25	F	9	5	0	1	0	3	5	0	1	0	12	10	0	2	0	1

N.C.L.: número de cuerpos luteos; N.E.V.: número de embriones vivos; N.E.V.I.: número de embriones vivos infectados; N.E.M.: número de embriones muertos; N.E.M.I.: número de embriones muertos infectados; R.E.:C.L.: relación embriones/cuerpos luteos.
Las cifras de las columnas N.C.L. que van acompañadas de * son *corpora albicans*.

Tabla 45: Valores medios del número de cuerpos luteos, número de embriones, vivos y muertos, número de embriones infectados y la relación embriones:cuerpos luteos obtenidos en cada uno de los grupos en estudio.

	Día 7 de gestación		Día 14 de gestación		Día 21 de gestación		Valores totales	
	Grupo A	Grupo B	Grupo C	Grupo D	Grupo E	Grupo F	Infectadas	Testigos
Nº de cerdas gestantes	4	2	5	3	2	2	11	7
Nº de cerdas vacías	1	1	1	0	3	1	5	2
Nº de camadas infectadas	0	0	2	0	0	0	2	0
Porcentaje de camadas infectadas	0	0	40	0	0	0	18,20	0
Nº total de cuerpos luteos (rango)	91 (20-25)	33 (16-17)	90 (15-21)	48 (14-19)	51 (15-36)	31 (12-19)	232 (15-36)	112 (12-19)
Nº total de embriones (rango)	73 (16-22)	22 (5-17)	63 (6-19)	23 (4-10)	13 (6-7)	22 (10-12)	149 (6-22)	67 (4-17)
Nº de embriones / Nº de cuerpos luteos	0,80	0,66	0,70	0,47	0,25	0,71	0,64	0,60
Nº de embriones normales (%)	68 (93,1)	22 (100)	50 (79,4)	21 (91,3)	13 (100)	18 (81,8)	131 (87,9)	61 (91)
Nº de embriones normales infectados (%)	0	0	4	0	0	0	4	0
Nº de embriones muertos (%)	5 (6,90)	0	13 (20,6)	2 (8,7)	0	4 (18,2)	18 (12,1)	6 (9)
Nº de embriones muertos infectados	0	0	0	0	0	0	0	0
Nº de embriones infectados / Nº total de embriones	0	0	0,06	0	0	0	0,027	0

4.5.4 Detección de VSRRP en las distintas muestras recogidas a lo largo del estudio

Las muestras de suero tomadas en todos los animales antes de la inoculación experimental con el VSRRP fueron negativas cuando se intentó el aislamiento del virus en cultivos de MAP. En los días 5 y 7 p.i. la mayoría de los animales de los grupos A, C y E fueron positivos, al menos en una de las extracciones, con la excepción de las cerdas 1 y 4 del grupo A. Los títulos víricos alcanzados oscilaron entre $< \log 2$ y $\log 5,1$ $DI_{50}CT/mL$. Las muestras de sangre tomadas en el momento del sacrificio de los animales, en el día 21 p.i., fueron todas negativas. Todas las muestras de suero obtenidas de las cerdas testigos a lo largo del periodo de estudio fueron negativas al VSRRP. Los resultados se muestran en la tabla 46.

Los hisopos, tanto nasales como de heces, tomados en los días 1, 3, 5, 7 y 9 p.i. fueron en su mayoría negativos cuando se intentó el aislamiento vírico en cultivos de MAP. Las únicas muestras que dieron resultados positivos, con títulos víricos que oscilaron entre $< \log 2$ y $\log 3,64$ $DI_{50}CT/mL$, corresponden a la cerda 5 del grupo A, la cerda 14 del grupo C y las cerdas 18, 19 y 20 del grupo E. Los resultados positivos, junto con el título vírico que presentaron aparecen en la tabla 47. Los hisopos recogidos antes de la inoculación con el VSRRP en las cerdas infectadas, así como todos los hisopos recogidos de las cerdas de los grupos testigos a lo largo del estudio fueron negativos.

Los intentos de aislar el VSRRP de muestras procedentes del aparato reproductor fueron en su mayoría infructuosos ya que todas las muestras de útero estudiadas fueron negativas, de igual forma que las de ovarios, con la única excepción del ovario derecho de la cerda 13 que dio un resultado positivo en el intento de aislamiento vírico en cultivo de MAP. Además, fueron positivos algunos de los ganglios uterinos estudiados, procedentes de las cerdas 9, 10, 12 y 13 del grupo C y de las cerdas 18, 19 y 21 del grupo E. Las muestras de los pulmones y los ganglios linfáticos submandibulares recogidas en la necropsia fueron también negativas en su mayoría. Sólo 4 de las muestras de pulmón y 7 de los ganglios linfáticos submandibulares procedentes de las cerdas de los grupos A, C y E dieron resultados positivos, aunque con títulos muy bajos, ya que oscilaron entre $< \log 2$ y $\log 2,7$ $DI_{50}CT/g$ de tejido. Todas las muestras obtenidas de las cerdas de los grupos B, D y F fueron negativas. Los resultados aparecen en la tabla 46.

Todos los resultados positivos en cultivos de MAP fueron confirmados por la técnica de RT-PCR.

Resultados

Tabla 46: Resultados del aislamiento del VSRRP en las muestras recogidas de las cerdas de todos los grupos en estudio, a lo largo del experimento.

Nº de la cerda	Grupo	Suero				Aparato reproductor					Otros órganos	
		A	D5	D7	D21	O.I.	O.D	UT.	G.L.U.I.	G.L.U.D.	Pulmón	G.L.S.I.
1	A	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-
2	A	-	+	+	-	-	-	Ø	Ø	Ø	+	-
			(3,85)	(<2)							(<2)	
3	A	-	+	+	-	Ø	Ø	Ø	Ø	Ø	-	-
			(3,83)	(<2)								
4	A	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-
5	A	-	+	+	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-
			(4,36)	(<2)								
6	B	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-
7	B	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-
8	B	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-
9	C	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+
			(2,5)	(3,34)								(2,66)
10	C	-	+	-	-	-	-	-	Ø	+	-	-
			(3,40)									
11	C	-	+	+	-	-	-	-	Ø	Ø	+	-
			(2,80)	(2,80)							(2,43)	
12	C	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+
			(3,38)	(2,51)								(<2)
13	C	-	+	+	-	-	+	-	-	+	Ø	Ø
			(3,90)	(2)								
14	C	-	+	-	-	-	-	Ø	Ø	-	+	+
			(3,15)								(<2)	(2,32)
15	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
16	D	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	Ø	-	-
17	D	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
18	E	-	+	+	-	-	-	-	+	+	-	+
			(3,58)	(2,57)								(2,71)
19	E	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-
			(2,40)	(4)								
20	E	-	+	-	-	-	-	-	-	Ø	-	+
			(5,31)									(<2)
21	E	-	+	+	-	-	-	-	+	-	+	+
			(3,49)	(3)							(<2)	(<2)
22	E	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+
			(<2)									(<2)
23	F	-	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	-	-
24	F	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-
25	F	-	-	-	-	-	-	-	Ø	Ø	-	-

A: suero obtenido antes de la inoculación con el VSRRP; D5, D7 y D21: muestras de suero correspondientes a los días 5, 7 y 21 p.i.; O.I.: ovario izquierdo; O.D.: ovario derecho; Ut: útero; G.L.U.I.: ganglio linfático uterino izquierdo; G.L.U.D.: ganglio linfático uterino derecho; G.L.S.I.: ganglio linfático submandibular izquierdo; Ø: muestra no recogida. Los títulos víricos están calculados como $DI_{50}CT/mL$ o g de tejido y están expresados en la forma de $\log X$, siendo X el número que aparece entre paréntesis.

Resultados

Tabla 47: Resultados positivos en el aislamiento vírico a partir de las muestras de hisopos recogidas a lo largo del periodo de estudio.

Nº de la cerda	Grupo	Tipo de hisopo	Día de obtención	Título vírico
5	A	heces	5	log 3,48
14	C	nasal	5	< log 2
18	E	nasal	5	< log 2
18	E	heces	5	log 3,57
18	E	heces	7	< log 2
19	E	heces	5	log 3
20	E	nasal	9	log 3,64

Los títulos víricos están calculados en la forma de $DI_{50}CT/mL$.

4.6. Estudio *in vitro* del efecto que el VSRRP tiene sobre los embriones en el estadio de entre 4 y 16 células: papel protector de la zona *pellucida*, susceptibilidad de los embriones a la infección por el virus, efecto del VSRRP sobre el desarrollo (objetivo B.5)

4.6.1. Desarrollo de los embriones *in vitro*

El grado de desarrollo *in vitro*, después de 72 horas de cultivo, alcanzado por los embriones de los grupos 1 y 2 (embriones cultivados en presencia del VSRRP y sus testigos) aparece resumido en la tabla 48. La tabla 49 muestra un resumen del grado de desarrollo alcanzado por los embriones microinyectados (grupos 3 y 4) tras 72 horas de cultivo *in vitro*. Como se puede apreciar en dichas tablas, la exposición de los embriones al VSRRP, ya sea en el medio de cultivo o por microinyección a través de la *zona pellucida* no tuvo ningún efecto en el grado de desarrollo alcanzado por los embriones. Así, en el grupo de los embriones incubados en presencia de virus 31 alcanzaron un grado de desarrollo avanzado, mientras que este número fue de 35 para sus testigos. En los grupos de embriones microinyectados, 11 de los 20 expuestos al VSRRP mostraron un grado avanzado de desarrollo, mostrando un grado de desarrollo semejante 10 de los 20 embriones que le sirvieron de testigos. El estudio estadístico llevado a cabo indicó que no existían diferencias estadísticamente significativas entre los embriones tratados y sus testigos ($p=0,14$ para los embriones incubados en presencia del VSRRP y sus testigos y $p=0,75$ para los embriones microinyectados con el VSRRP y sus testigos).

Resultados

Tabla 48: Grado de desarrollo *in vitro* alcanzado por los embriones cultivados durante 72 horas en presencia del VSRRP y sus testigos.

Nº inicial de células	Nº de embriones		Grado de desarrollo <i>in vitro</i>					
			Ninguno		Moderado		Avanzado	
	Tratados	Testigos	Tratados	Testigos	Tratados	Testigos	Tratados	Testigos
4	33	33	6	2	4	0	23	31
5-8	5	4	0	2	1	0	4	2
+8	5	4	1	2	0	0	4	2

Tabla 49: Grado de desarrollo *in vitro* alcanzado por los embriones microinyectados con el VSRRP y cultivados posteriormente durante 72 horas y sus testigos.

Nº inicial de células	Nº de embriones		Grado de desarrollo <i>in vitro</i>					
			Ninguno		Moderado		Avanzado	
	Tratados	Testigos	Tratados	Testigos	Tratados	Testigos	Tratados	Testigos
4	15	12	7	7	0	0	8	5
5-8	4	4	1	2	0	0	3	2
+8	1	4	1	1	0	0	0	3

4.6.2. Detección del VSRRP en los embriones tras 72 horas de cultivo *in vitro*

El VSRRP no pudo ser aislado de ninguno de los grupos de embriones, ni cultivados en presencia del VSRRP, ni microinyectados. Los intentos de aislamiento vírico llevados a cabo con los líquidos de lavado de los embriones tampoco reveló la presencia del VSRRP con la única excepción del primer lavado de uno de los grupos de embriones incubados en presencia del VSRRP. Este resultado positivo fue confirmado por la prueba de RT-PCR. Esta misma prueba dio resultados negativos cuando se aplicó a los grupos de embriones. El ECP característico del VSRRP que apareció en los testigos positivos inoculados en los cultivos de MAP indicó que el lote de MAP empleado tenía una sensibilidad al virus suficiente para detectar 10 DI₅₀CT. Los testigos positivos utilizados en la prueba de RT-PCR revelaron que la sensibilidad de esta técnica era suficiente para detectar 100 DI₅₀CT.

Los resultados de las IFD llevadas a cabo en los embriones indicaron que en ninguno de ellos estaba presente el VSRRP, al no aparecer en ningún caso fluorescencia específica.

V. DISCUSIÓN

5.1. Objetivo A: efecto de la infección por el VSRRP en el verraco

Los resultados de nuestro estudio muestran que la infección de verracos adultos con la cepa española del VSRRP 5710 no produce una sintomatología clínica característica, a pesar de quedar fehacientemente demostrada por el reaislamiento a partir de muestras de suero y diversos órganos o por el desarrollo de anticuerpos frente al VSRRP.

En este sentido cabe destacar que ninguno de los animales utilizados desarrolló ningún síntoma respiratorio y los signos de depresión, anorexia o inapetencia descritos por otros autores (Blackburn, 1991; Loula, 1991; Gordon, 1992, Hopper *et al.*, 1992) sólo aparecieron de forma esporádica en algunos animales, siendo además de corta duración. Sin embargo, no se observaron pérdidas de la libido como las descritas por Feitsma *et al.* (1992) y Hopper *et al.* (1992). Una posible explicación a la disparidad existente entre las observaciones clínicas enumeradas por los autores anteriormente mencionados y los resultados obtenidos en nuestro trabajo podría ser una diferencia en la patogenicidad entre las cepas implicadas en cada estudio. Así, cabe destacar que se han descrito grandes diferencias en términos de inducción de sintomatología clínica y respuesta inmunológica entre distintos aislados del VSRRP, especialmente entre aislados europeos y americanos (Wensvoort *et al.*, 1992; Nelson *et al.*, 1993). Además, la presentación de signos de depresión y anorexia parece depender mucho de la respuesta individual a la infección, ya que animales inoculados experimentalmente con $DI_{50}CT$ muy semejantes de la misma cepa de virus muestran una respuesta a la infección muy distinta, pudiendo pasar totalmente desapercibida, como sucedió en la mayoría de los verracos utilizados o dando lugar a una sintomatología muy notoria como la desarrollada por el verraco número 2.

En cuanto a la pirexia, cabe destacar que no todos los animales mostraron temperaturas febriles y aquellos que las presentaron tuvieron temperaturas rectales de entre 39,5 y 41°C durante periodos de tiempo bastante cortos, en muchos casos de sólo un día, entre los días 2 y 7 p.i.. Estos resultados coinciden plenamente con las observaciones previas que indican que tan sólo un 30% de los animales infectados con este virus alcanzan temperaturas superiores a los 40°C.

Cuando en estos animales investigamos la duración y la extensión de la viremia después de la inoculación experimental del VSRRP, fue posible aislar el virus en el suero de forma constante desde el día 2 ó 3 p.i. hasta los días 10 ó 15 p.i., siendo la mayoría de los animales negativos en el día 21 p.i., con la única excepción de dos verracos que fueron positivos en el día 23 p.i.. Estos resultados son bastante similares a los obtenidos por Christianson *et al.* (1993) y Mengeling *et al.* (1995) que describen viremias de 9 y 14 días respectivamente en hembras gestantes y Wills *et al.* (1995) que consiguen aislar el virus en lechones inoculados experimentalmente hasta el día 11 p.i..

Discusión

Sin embargo, existen trabajos que describen viremias más largas en lechones inoculados experimentalmente, siendo posible encontrar el VSRRP de forma constante en el suero de los animales hasta el día 35 p.i. (Yoon *et al.*, 1993), el día 28 p.i. (Rossow *et al.*, 1994a) y el día 21 p.i. (Rossow *et al.*, 1995). Obviamente, la duración de la viremia puede estar influida por varios factores, entre los cuales cabe destacar las cantidad de virus a la que son expuestos los animales, la edad de los mismos y la virulencia de la cepa del VSRRP empleada. Estos factores, entre otros, podrían explicar las discrepancias existentes entre nuestros resultados y los obtenidos por otros autores, aunque también la sensibilidad de la técnica empleada en la detección del virus podría ser un factor a considerar.

En cuanto a la distribución orgánica del VSRRP después de la inoculación experimental, todos los trabajos realizados hasta el momento se han llevado a cabo utilizando lechones como animal de experimentación, sin que exista un estudio pormenorizado de dónde se localiza el VSRRP en animales adultos. En el presente trabajo, llevado a cabo con verracos inoculados experimentalmente por la vía intranasal con el VSRRP y sacrificados secuencialmente a lo largo de 30 días hemos podido comprobar que el aislamiento del virus es fácil y constante a partir de los órganos donde se han descrito lesiones como consecuencia de la infección, fundamentalmente el pulmón y los macrófagos alveolares, de donde es posible aislar el virus hasta el día 30 p.i.. Estos resultados están en concordancia con los obtenidos por Mengeling *et al.* (1995), Rossow *et al.* (1995), Halbur *et al.* (1996) y Rossow *et al.* (1996a) realizando infecciones experimentales en lechones. Estos autores han sido capaces de detectar el virus en este órgano por técnicas de inmunohistoquímica, aislamiento en macrófagos alveolares o por un cocultivo de macrófagos alveolares en la línea celular MARC-145 en los días 21, 28 y hasta 70 p.i. en función de la técnica utilizada.

Además del pulmón, los ganglios linfáticos analizados resultaron ser un lugar importante de localización del VSRRP, pudiendo aislarse fácilmente hasta el día 30 p.i., aun cuando en ese momento no era detectable el virus en el suero. De entre todos los ganglios linfáticos analizados son los submandibulares e inguinales superficiales y en menor medida los ganglios mesentéricos donde de forma más constante se aisló el VSRRP. Estos resultados son muy similares a los aportados por otros autores (Rossow *et al.*, 1994a; Halbur *et al.*, 1996). Igualmente, los resultados de aislamiento del VSRRP a partir de las amígdalas obtenidos por los autores anteriormente citados, junto con los de Mengeling *et al.* (1995), coinciden plenamente con los obtenidos en nuestro trabajo ya que, a pesar de las lógicas variaciones, el virus se aisló de forma constante hasta el final del periodo de estudio. La localización del VSRRP en las amígdalas en la fase inicial de la infección sería un fenómeno lógico y fácilmente explicable teniendo en cuenta que este lugar es una vía normal de procesamiento de antígenos. Sin embargo, el que se siga detectando el virus después

de acabada la viremia parece indicar que puede persistir en este órgano, multiplicándose periódicamente, o bien que la exposición al virus sería continua como consecuencia de la eliminación de detritus celulares en los que iría vinculado el virus desde el pulmón, fuente primaria de multiplicación. Esta última posibilidad parece ser la más probable ya que la localización en las amígdalas se produce también en ausencia de viremia como ha quedado fehacientemente demostrado en nuestro estudio y previamente habían comprobado otros autores (Rossow *et al.*, 1994a y 1996a; Wills *et al.*, 1995), determinando unos que el virus se localiza en los macrófagos de las amígdalas y otros que la presencia del virus en este órgano se puede alargar hasta el día 157 p.i..

En las muestras obtenidas de ileon también se aisló el VSRRP de forma bastante constante hasta el día 23 p.i., coincidiendo estos resultados con los aportados por Mengeling *et al.* (1995). El aislamiento del virus en este lugar junto con la presencia, ya demostrada, en las placas de Peyer, las vellosidades intestinales y en la lámina propia del intestino delgado (Halbur *et al.*, 1996) permite plantear que el VSRRP está presente en el tejido linfoide asociado al intestino, eliminándose a la luz del mismo, probablemente incluido en macrófagos o vesículas que atraviesan el epitelio intestinal, pudiendo ser éste el origen del virus en las heces.

Finalmente, en el timo, el bazo y el hígado el aislamiento del virus fue posible durante el periodo de la viremia, aproximadamente durante los 9 primeros días p.i., mientras que a partir de este momento los aislamientos fueron esporádicos. De todos estos órganos, llama la atención cómo, a pesar de su amplia distribución por los distintos órganos linfoides, el VSRRP no se encuentra de forma constante en el bazo. De hecho, aunque nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos por Mengeling *et al.* (1995), están también en clara contraposición con los obtenidos por otros autores para los cuales el bazo es un órgano muy adecuado para la detección del virus (Pol *et al.*, 1991; Paton *et al.*, 1992; Stevenson *et al.*, 1993; Rossow *et al.*, 1994a, 1995; Halbur *et al.*, 1996).

La mayoría de los estudios anteriormente utilizados para la discusión sobre la localización orgánica del VSRRP se han realizado utilizando técnicas de inmunohistoquímica, de forma que, con la excepción del de Rossow *et al.* (1995), no existe ningún trabajo en el que se realizaran aislamientos y titulaciones del virus por lo que no es posible determinar si el título presente en los distintos órganos era superior o inferior al obtenido en el suero. En términos generales, los resultados obtenidos por Rossow *et al.* (1995) coinciden con los nuestros en el sentido de que en prácticamente todos los casos el título vírico obtenido en las muestras procedentes de los distintos órganos fue superior al obtenido en el suero de ese animal en el día del sacrificio. Además, hay que destacar que en nuestro estudio se aisló el virus en distintos órganos de 5 de los 6 verracos que no

presentaban viremia en el momento del sacrificio. Este panorama implicaría que los lugares en que está presente el virus en el momento del sacrificio, como el pulmón y distintos órganos del sistema linfático, entre los que destacan los ganglios linfáticos submandibulares y las amígdalas, son sitios activos de multiplicación del VSRRP. Aparentemente, en estos órganos, el virus se multiplica en células con morfología similar a la de los macrófagos o células dendríticas (datos no mostrados). Este fenómeno ya ha sido descrito por otros autores, planteando la posibilidad de que las células donde se multiplica el virus son macrófagos y células similares a éstos, habiéndose encontrado en las células de Kupffer del hígado, en las células interdigitantes del timo, en las células dendríticas de los tejidos linfoides y en las células reticulares del bazo (Magar *et al.*, 1993; Rossow *et al.*, 1995; Halbur *et al.*, 1996). Según estos autores, al multiplicarse el virus en estas poblaciones celulares sería el responsable de las lesiones que se observan tras la infección, fundamentalmente de necrosis de los centros germinales en los ganglios linfáticos o las criptas amigdalares (Magar *et al.*, 1993; Rossow *et al.*, 1994a, 1996a; Halbur *et al.*, 1995).

En función de los resultados anteriormente expuestos, tanto los referentes a este trabajo como los aportados por otros autores, se puede aceptar que el primer lugar de multiplicación del VSRRP son los MAP y a partir de ellos la infección se podría extender a los macrófagos intravasculares del pulmón y a los monocitos circulantes, además de encontrarse de forma libre en el torrente circulatorio, como es deducible de su aislamiento en el suero. Esta diseminación sería responsable de la distribución del virus en los ganglios linfáticos, lo que explicaría su presencia de forma tan constante y con títulos víricos tan altos en todos los órganos del sistema linfático. La multiplicación del virus en los órganos linfoides iría seguida de fenómenos de exocitosis, viremia y transporte del virus a otros órganos, siendo posiblemente responsable de las viremias tan prolongadas que se han asociado a la enfermedad (Rossow *et al.*, 1995). Además de en su forma libre, el virus puede llegar a los distintos órganos con los monocitos que migran del torrente circulatorio para convertirse en macrófagos tisulares. De esta forma se cree que puede alcanzar el aparato reproductor, tanto en el macho como en la hembra.

En nuestro estudio ha sido posible aislar el VSRRP de distintos lugares del aparato reproductor del verraco desde el día 4 p.i. hasta el día 30 p.i.. Así, aparte de los ganglios linfáticos testiculares, de donde era previsible su aislamiento dada la distribución del virus por todo el sistema ganglionar, cabe destacar el epidídimo, órgano del que se ha aislado el VSRRP a partir de muestras de sus tres porciones. La porción de donde se aisló con mayor frecuencia fue la cabeza con un 38,5% de muestras positivas, seguida del cuerpo y la cola con un 20% y un 12,8% de muestras positivas, respectivamente. Aparentemente, la presencia del VSRRP en el epidídimo es difícil de explicar como no sea por una infección directa de ese órgano, del testículo o a través de la sangre y los fluidos tisulares que se filtran en el aparato genital. Esta última posibilidad parece la

Discusión

más probable ya que si el VSRRP se hubiera multiplicado en el testículo debería haber sido aislado de forma bastante constante. Sin embargo, sólo se pudo aislar de los testículos de uno de los verracos, siendo además el título vírico muy bajo, lo cual parece indicar la no multiplicación del virus en esta localización. Parece más bien, por tanto, que su presencia se deba a la distribución orgánica del virus tanto por vía hematogena como linfática. Apoya esta teoría el hecho de que el único verraco positivo fuera en esos momentos virémico y que el título vírico en el suero fuera superior al encontrado en el testículo.

El cómo llega el VSRRP a través de la sangre y fluidos tisulares que se filtran en el aparato genital podría justificarse por la capacidad que tiene este virus para multiplicarse en los monocitos circulantes (Voicu *et al.*, 1994), migrando éstos fuera del torrente circulatorio para convertirse en macrófagos tisulares. De hecho, la presencia de macrófagos intraepiteliales en el conducto epididimario ha sido descrita en el hombre (Wang y Holstein, 1983), en el toro (Goyal, 1985) y en el verraco (Briz y Bonet, 1992). Además, esta posibilidad está de acuerdo con la descripción del virus dentro de las células con morfología distinta a los espermatozoides en el eyaculado y con los títulos víricos tan bajos encontrados en las muestras procedentes del epidídimo. Su vinculación a los macrófagos del epidídimo también explicaría el que fuera posible aislar el VSRRP con mayor frecuencia a partir de la cabeza ya que la presencia de células fagocíticas entre el esperma es más notoria en la región cefálica que en las regiones corporal y caudal del epidídimo (Briz y Bonet, 1992). Esta diferencia en la cantidad de células macrofágicas observadas en las dos primeras regiones del epidídimo podría explicarse porque la vascularización del conducto epididimario sigue dos vías: la arteria espermática, que irriga las regiones epididimarias cefálica y corporal, y la arteria epididimaria, de origen iliaco, que irriga la región epididimaria caudal (Clavert *et al.*, 1981). Además, estudios llevados a cabo con otros virus porcinos como el parvovirus porcino (PVP) han mostrado distribuciones parecidas ya que entre los diferentes órganos del aparato reproductor, sólo se encuentra en forma de agregados en la luz de los tubos seminíferos y en la cabeza del epidídimo, mientras que el cuerpo y la cola están libres del virus (Thacker *et al.*, 1987), limitándose la infección a la vasculatura del intersticio del epidídimo. Sin embargo, esta contaminación, tal como aparentemente sucede en el caso del VSRRP, permite que el PVP se elimine por el semen de los animales infectados, incluso asociado a la membrana de los espermatozoides (Gradil *et al.*, 1990).

Por otra parte, el aislamiento del VSRRP en las glándulas anejas se produjo en una proporción relativamente baja dado que tan solo un 25% de las próstatas, un 7,5% de las glándulas bulbouretrales y un 5,1% de las glándulas vesiculares fueron positivas al aislamiento vírico, y además con títulos muy bajos. Estos resultados coinciden con los aportados recientemente por Shin *et al.* (1996a) utilizando una técnica de hibridación *in situ* con la que determina señales positivas en los testículos, el epidídimo, la próstata y las glándulas bulbouretrales. Estas señales no se han

podido asociar a un tipo celular específico, apareciendo células positivas en el intersticio adyacente a los vasos sanguíneos entre los túbulos seminíferos del testículo y en el semen del epidídimo en la luz de los túbulos dentro de células con morfología distinta a la de los espermatozoides.

Así, el bajo número de $DI_{50}CT$ encontrado en estos lugares, unido a los resultados aportados por Shin *et al.* (1996a), hace pensar que probablemente no se produzca una multiplicación activa del virus en estos lugares, sino que el virus puede tener su origen en la diseminación orgánica que se produce durante la viremia, encontrándose presente en los macrófagos e histiocitos que han migrado a estos tejidos. En este sentido, la eliminación del virus por el semen sería irregular, dependiendo de si los monocitos o macrófagos que migran a estos lugares están infectados por el virus o no, explicando de este modo la detección y el aislamiento de forma intermitente en el semen de verracos infectados preconizada por algunos autores (Christopher-Hennings *et al.*, 1995a,b; 1996a). Además, fenómenos similares han sido descritos para otros virus que afectan al cerdo (Biront y Bonte, 1983).

Por otro lado, es un hecho conocido que después de la infección con el VSRRP, este virus se puede eliminar por distintas vías, siendo posible aislarlo de las secreciones nasales, de la saliva, de la orina, de las secreciones prepuciales, de las heces y del semen de los animales infectados (Edwards *et al.*, 1992; Christianson *et al.*, 1993; Yoon *et al.*, 1993; Rossow *et al.*, 1994a; Swenson *et al.*, 1994a; Christopher-Hennings *et al.*, 1995a; 1996a; Teuffert *et al.*, 1995; Wills *et al.*, 1995b). Los resultados obtenidos en nuestro trabajo parecen confirmar que la eliminación del VSRRP es bastante frecuente a través de las heces, la orina y las secreciones nasales, ya que, en términos generales, el virus se aisló de forma constante durante el periodo virémico e incluso, en el caso de las heces, hasta el día 23 p.i.. Por el contrario, el aislamiento del virus en las secreciones oro-faríngeas y prepuciales fue sólo esporádico, estando presente únicamente en las primeras en los días 5 y 9 p.i. y en las segundas en los días 4, 5 y 9 p.i..

El hecho de que los títulos víricos obtenidos a partir de las muestras de heces sean, en general, más altos que los obtenidos en otras localizaciones, unido a la frecuencia, mayor de la esperada si nos remitimos a la bibliografía, con la que fue posible aislar el virus de las heces hace necesario considerar la vía feco-oral como una vía de transmisión, junto con la oro-nasal, a tener muy en consideración en la transmisión de la enfermedad. La importancia de estas dos vías en la diseminación de la enfermedad está apoyada por el hecho de que la transmisión depende de la existencia de un contacto muy estrecho entre los animales, careciendo de importancia, aparentemente, la transmisión por aerosoles a largas distancias (Wills *et al.*, 1994).

Finalmente, todos estos resultados, incluidos los aportados por otros autores, cuando se

consideran en su conjunto, parecen indicar un patrón de eliminación poco constante, influido de forma muy importante por el método de recogida de la muestra. Este patrón coincide con la teoría de Yoon *et al.* (1993) en el sentido de que la eliminación del VSRRP por distintas vías tiene una duración similar al periodo de viremia, aunque el aislamiento del virus se realiza de forma menos constante que en el suero.

Por otro lado, el VSRRP sólo se pudo aislar en el semen obtenido del epidídimo de uno de los animales en estudio (verraco número 14), lo que contrasta con el hecho de que 8 de los 20 verracos estudiados presentaran muestras de epidídimo positivas al virus. La única explicación que encontramos es que si el virus va unido a macrófagos, como aparentemente así sucede, al estar éstos presentes en menor proporción en la cola del epidídimo, lugar del cual se tomaron las muestras de semen analizadas en este estudio, la cantidad de virus presente puede haber sido tan baja que las técnicas de detección empleadas no hayan sido lo suficientemente sensibles como para obtener resultados positivos. Además, tampoco fue posible aislar el VSRRP de forma constante en las muestras de eyaculados obtenidas secuencialmente de los verracos empleados para el estudio del efecto del virus sobre la calidad espermática, con la muy importante excepción del verraco número 7 (perteneciente al grupo B) y el verraco número 3 (perteneciente al grupo A). Estos verracos eliminaron el virus en una sola recogida tomada en el día 7 p.i.. Así, y dentro de los límites de nuestro sistema de detección de virus, no obtuvimos una clara evidencia que de forma concluyente nos indique que el VSRRP se elimina vía semen. Estos resultados están de acuerdo con otros previamente publicados que hacen referencia a resultados negativos o inconsistentes en el aislamiento del VSRRP en el semen de verracos infectados de forma natural o experimental (Robertson, 1992; Ohlinger *et al.*, 1993; Yaeger *et al.*, 1993; Swenson *et al.*, 1994b; Teuffert *et al.*, 1995). Por el contrario, nuestros resultados difieren de los trabajos que indican una clara evidencia en la eliminación de cepas americanas del VSRRP a través del semen (Swenson *et al.*, 1994a; Christopher-Hennings *et al.*, 1995a-c; 1996a,b; Molitor y Shin, 1995; Nielsen *et al.*, 1995; Benfield *et al.*, 1996).

Estas diferencias tan evidentes entre los distintos estudios, sobre todo entre los estudios llevados a cabo con cepas americanas y cepas europeas, se pueden deber a una serie de factores. En primer lugar, es posible que existan diferencias importantes entre las distintas cepas, como ya se ha demostrado en cuanto a su constitución antigénica y su patogenicidad (Wensvoort *et al.*, 1992; Bautista *et al.*, 1993; 1994; Nelson *et al.*, 1993; Benfield *et al.*, 1994; Kwang *et al.*, 1994; Drew *et al.*, 1995; Katz *et al.*, 1995; Magar *et al.*, 1995a), aceptándose en la actualidad que los aislados americanos y europeos representan dos genotipos bien diferenciados (Meng *et al.*, 1995; Suárez *et al.*, 1996a). Estas diferencias pueden dar lugar a un proceso virémico, a una distribución orgánica y a un patrón de eliminación distintos. Por otra parte, en segundo lugar, estas diferencias

se pueden deber a las distintas sensibilidades de las técnicas de detección o aislamiento empleadas. En este sentido cabe destacar que la gran mayoría de los estudios que demuestran la eliminación constante del VSRRP por el semen se han realizado con pruebas de detección de virus indirectas como la inoculación a lechones o directas como la RT-PCR y la hibridación *in situ*, técnicas que muestran un alto grado de sensibilidad al permitir la primera realizar inoculaciones experimentales de grandes volúmenes de semen y las otras al tener contrastados límites de detección de 10 viriones/mL de semen (Christopher-Hennings *et al.*, 1995b) ó de 0,001 DI₅₀CT (Shin *et al.*, 1996b). En nuestro estudio, empleando fundamentalmente el aislamiento del VSRRP en cultivos de MAP, la sensibilidad de la técnica no fue muy buena pues la capacidad para detectar dosis infectivas bajas del VSRRP (≤ 20 DI₅₀CT/mL) difiere sustancialmente entre los distintos lotes de MAP empleados de tal manera que la menor cantidad de virus que fue posible detectar en todos los lotes utilizados fue de 200 DI₅₀CT/mL, siendo variables los resultados cuando estaban presentes cantidades menores del virus en el inóculo. Por tanto, si cantidades de un orden de magnitud muy bajo estuvieran presentes en el semen de los verracos infectados en nuestro estudio, lo que es muy probable si el virus se asocia a los macrófagos en el semen y en función de las DI₅₀CT detectadas en las muestras de semen positivas, próximas al límite de sensibilidad de la técnica, la metodología empleada no habría tenido la sensibilidad suficiente para ofrecer resultados positivos. Ni siquiera en el caso de la inoculación experimental en lechones pues las dosis inoculadas fueron muy bajas, del orden de 1 mL de semen.

En conclusión, y a pesar de todo lo anteriormente expuesto, de este estudio se puede sugerir que el VSRRP puede ser eliminado por el semen en la fase inicial de la enfermedad asociado a células sanguíneas (van Woensel *et al.*, 1994) lo cual, unido al hecho de que los órganos linfoides sigan siendo positivos después de que termine la viremia, parece indicar que la fuente del virus presente en el semen son los ganglios linfáticos donde se multiplicaría el virus y desde donde pasaría al semen unido a los macrófagos que migran a esta localización.

Por otra parte, uno de los aspectos más importantes de nuestro estudio ha sido conocer el efecto que la infección del VSRRP en el verraco tiene sobre la calidad espermática, máxime cuando el virus está presente en el aparato reproductor y en el semen de estos animales.

El método más empleado y fácil para determinar una alteración en la calidad espermática del semen procedente de verracos es analizar la concentración de espermatozoides del eyaculado. También se suele estudiar la morfología de los espermatozoides para ver si existe un aumento en el porcentaje de formas anormales y el porcentaje de espermatozoides móviles ya que todos estos parámetros han sido correlacionados con la fertilidad.

Discusión

En nuestro estudio se midieron tanto el volumen del eyaculado como la concentración de espermatozoides. Sin embargo no se pudieron comparar los resultados obtenidos antes y después de la inoculación con el VSRRP ya que sólo se analizó un ciclo eyaculatorio en cada parte del estudio. Tanto el volumen como la morfología de los espermatozoides puede ser altamente dependiente de la técnica de recogida y deberían ser analizados dos o más ciclos eyaculatorios para que los datos obtenidos sean significativos (Hurtgen, 1984).

Un aumento en el número de espermatozoides con formas anormales implica, lógicamente, una disminución de espermatozoides normales. El porcentaje de espermatozoides normales es frecuentemente empleado como un fácil indicador de la fertilidad dado que con esta variable todas las recogidas de semen que tienen valores por debajo de lo normal están incluidas. El análisis del porcentaje medio de espermatozoides normales en los verracos del grupo A mostró una disminución p.i., aunque careció de significación estadística.

Sin embargo, los verracos del grupo B mostraron una mayor bajada de espermatozoides normales después de la inoculación con el VSRRP, a pesar de que esta inoculación se hizo con una dosis infectiva menor. En este grupo, un aspecto clínico importante fue la existencia de ocho eyaculados potencialmente subfértiles después de la inoculación con el VSRRP y ninguno antes de la misma.

Dado que la espermatogénesis en el verraco dura 34 días y los espermatozoides necesitan 10 días más para madurar y pasar a través del epidídimo, cualquier alteración en la calidad espermática debida a una alteración en la espermatogénesis debería aparecer en las recogidas de semen efectuadas entre los días +10 y +40. En nuestro estudio los verracos del grupo B sufrieron la mayor disminución del porcentaje de espermatozoides normales entre los días 21 y 42 después de la inoculación con el VSRRP. Esta disminución sugiere dos posibilidades: un efecto directo del VSRRP sobre la espermatogénesis del verraco (Swiestra, 1968) o un efecto indirecto como consecuencia de un aumento de la temperatura corporal después de la infección. Sin embargo, nosotros consideramos que esta última posibilidad es la menos aceptable dado que ninguno de los verracos del grupo B alcanzó temperaturas consideradas clínicamente febriles después de la inoculación ($>39,7^{\circ}\text{C}$).

Por otra parte, un efecto directo del virus sobre la espermatogénesis, probablemente debería estar acompañado por un aumento significativo de las formas anormales primarias. Sin embargo, en nuestro estudio la disminución en el porcentaje de espermatozoides normales o el aumento en el número total de espermatozoides con alteraciones morfológicas en los verracos del grupo B se

debió a un aumento en el número de espermatozoides con gotas citoplasmáticas distales y, en menor medida, de espermatozoides con anomalías en la cola. La significación real de estas anomalías del espermatozoide no está bien definida dado que los factores asociados a la persistencia de gotas citoplasmáticas distales y colas en látigo no son completamente conocidos, aunque este fenómeno puede estar relacionado con varios aspectos fisiopatológicos como la frecuencia de las recogidas (Einarsson y Gustafsson, 1973; Bonte, 1978; Hurtgen, 1980). En cualquier caso, en nuestro estudio la baja incidencia de estas anomalías secundarias no puede justificar un efecto directo del VSRRP sobre la espermatogénesis.

De hecho, desde el punto de vista de los resultados individuales, nosotros consideramos que las anomalías observadas en los espermatozoides son más el resultado de variaciones individuales que de la infección por el VSRRP. Por ejemplo, las anomalías en el semen de los verracos 2, 4, 5 y 6 del grupo A aparecen antes de la inoculación con el virus y en los verracos 7, 8 y 9 del grupo B estas anomalías fueron observadas en recogidas de semen alternas. Además, desde el punto de vista del análisis individual, sólo se observó un aumento del 10% en el porcentaje de espermatozoides con anomalías de cola después de la inoculación con el VSRRP, en dos recogidas de semen del verraco 7 del grupo B y éstas se produjeron en días de recogida alternos (días 21 y 35 p.i.).

El porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales se considera como uno de los más importantes marcadores de fertilidad. Este parámetro de calidad, usualmente está bien correlacionado con la ORT, e incluso con la motilidad, tanto en el semen fresco (Johnson y Truitt-Gibert, 1982) como en el congelado (Schilling *et al.*, 1984). De hecho, estos tres parámetros han sido los más afectados por la inoculación experimental del VSRRP en ambos grupos de verracos, A y B. Después de la inoculación con el VSRRP el porcentaje medio de espermatozoides con acrosomas normales descendió claramente en ambos grupos de verracos.

Se considera que la gran mayoría de los defectos que se observan en los acrosomas son debidos a una alteración de la espermatogénesis (Bane y Nicander, 1966). Sin embargo, una alteración en el porcentaje de espermatozoides con acrosomas normales necesita ir acompañado de un aumento muy significativo de otra anomalía primaria de los espermatozoides como por ejemplo una elevación en el porcentaje de espermatozoides con cabezas anormales. En nuestro estudio esta situación nunca se presentó.

Por otra parte, se considera que la fertilidad se ve seriamente reducida cuando el porcentaje de espermatozoides con acrosomas anormales supera el 35% (Andersen, 1974). Desde el punto de vista clínico, los valores medios de los verracos del grupo A indican un total de tres recogidas

potencialmente subfértiles en los días 21, 28 y 35 p.i.. El análisis individual de estos resultados nos enseña que existen un 30% de recogidas potencialmente subfértiles después de la inoculación con el VSRRP en comparación con ninguna antes de la inoculación. En los verracos del grupo B solamente existieron dos recogidas potencialmente subfértiles, en los días 28 y 35 p.i.. Individualmente, el 18,75% de las recogidas obtenidas después de la inoculación con el VSRRP en los verracos del grupo B fueron potencialmente subfértiles en contraste con ninguna antes de la exposición al virus. Dado que estos resultados no pueden ser atribuidos a un efecto directo del VSRRP sobre la espermatogénesis o a un aumento significativo de la temperatura de los verracos después de la inoculación, en nuestra opinión es necesaria una mayor investigación para esclarecer la causa que lo provoca.

El análisis del porcentaje de motilidad revela algunos resultados interesantes basados en las diferencias significativas entre los grupos de verracos inoculados con alta y baja dosis infectiva del VSRRP (grupo A y B respectivamente). En los verracos del grupo A se produjo una disminución muy significativa estadísticamente de los valores medios de la motilidad después de la inoculación con el virus. Por el contrario, en los verracos del grupo B la disminución producida en los valores medios de la motilidad fue mucho menor y no significativa estadísticamente. Además, el análisis de los valores medios de este parámetro, desde el punto de vista de la fertilidad indica que en los verracos del grupo A un total de tres recogidas correspondientes a los días 14, 21 y 28 p.i. fueron potencialmente subfértiles (<60%). Adicionalmente, cuando tomamos en consideración los valores individuales de cada verraco perteneciente al grupo A, el porcentaje de recogidas con valores de motilidad en el límite o por debajo de la fertilidad aumenta hasta un 27,50% después de la inoculación con el VSRRP. Por otra parte, ni los valores medios ni los valores individuales de motilidad en los verracos del grupo B estuvieron cercanos o por debajo del nivel del 60% indicativo de una fertilidad reducida. Disminuciones del porcentaje de motilidad normalmente se justifican como consecuencia de un aumento de la temperatura (van Denmark y Free, 1970), sin embargo, en nuestro estudio, el aumento de temperatura p.i. con el VSRRP no fue muy pronunciado, como previamente se mencionó.

De los resultados de nuestro estudio se puede concluir que la infección de verracos con el VSRRP induce una reducción significativa en la motilidad y en el porcentaje de acrosomas normales en los espermatozoides.

La detección del VSRRP en el semen de verracos infectados, unido a los estudios epidemiológicos (Robertson, 1992; Yaeger *et al.*, 1993), que han demostrado que el virus puede ser transmitido a la cerda por el semen, ha dado lugar a una importante preocupación entre los ganaderos dado el riesgo que supone introducir el VSRRP en una granja a través del semen y el

Discusión

uso de la inseminación artificial. En este sentido, otro de los objetivos planteados en este estudio fue conocer la capacidad de transmisión del VSRRP a través del semen mediante la inseminación de cerdas nulíparas seronegativas a este virus o previamente preinmunizadas con una vacuna comercial frente al VSRRP.

Los resultados de este estudio indican que es posible la transmisión del VSRRP a través de semen contaminado con el virus con independencia de si las cerdas son seronegativas o preinmunizadas, dado que el virus se aisló en las muestras de suero y de los distintos tejidos recogidos en la necropsia. Además, las cerdas de ambos grupos expuestas al VSRRP por la vía genital mostraron signos clínicos de la enfermedad, aunque únicamente como inapetencia transitoria y, en algunos individuos, por el desarrollo de temperaturas febriles, sin que existieran diferencias entre ambos grupos de animales.

Estos resultados coinciden plenamente con los obtenidos por Swenson *et al.* (1996a) y parcialmente con los publicados por Gradil *et al.* (1996) empleando semen contaminado con el VSRRP procedente de verracos infectados experimentalmente, aunque la transmisión del virus sólo se pudo conseguir en cerdas previamente sincronizadas antes de la inseminación y no en aquellas inseminadas después de la salida a celo natural. Posiblemente esta segunda situación, según plantea el autor, se debió a la inexistencia de virus en el semen empleado, como posteriormente se demostró en una prueba biológica en lechones.

Sin embargo, la transmisión del VSRRP por la vía genital no siempre se ha podido demostrar. En este sentido, dos estudios llevados a cabo por Swenson *et al.* (1994a) y Teuffert *et al.* (1995) empleando semen de verracos infectados experimentalmente con el VSRRP recogido en los días 7, 8, 9, 14 y 21 p.i. y 4, 8 y 12 p.i. respectivamente no consiguieron demostrar la presencia del virus en las cerdas inseminadas ni por aislamiento ni por seroconversión aunque existía la seguridad de la presencia del virus según demostró una prueba biológica llevada a cabo con lechones.

Estas discrepancias en la capacidad de transmisión venerea del VSRRP se pueden deber a una serie de factores previamente identificados para otras infecciones víricas como son:

1. La cepa de virus empleada. Como ya se ha mencionado, existen grandes diferencias tanto antigénicas como de patogenicidad entre las distintas cepas, pudiendo, quizás, algunas de ellas replicarse con mayor facilidad en el aparato reproductor como consecuencia de diferencias en su capacidad invasiva.

Discusión

2. La dosis de virus inoculada. En nuestro estudio se utilizó una cantidad muy alta de virus (4×10^6 DI_{50CT}), la cual no es probable que se encuentre de forma natural en el semen. Esto quiere decir que, aunque nuestros resultados permitan concluir que la transmisión del VSRRP por el semen es posible, puede ser que la cantidad de virus presente de forma natural no sea suficiente para producir una infección por la vía intrauterina ya que la cantidad de virus necesaria para que se produzca depende, entre otros factores, de la ruta de infección. Así, la dosis infectante mínima del VLD, virus muy similar al VSRRP, se ha demostrado que varía mucho en función de la ruta de inoculación que se emplee, de forma que la inoculación intraperitoneal tiene una dosis mínima de 1 DI_{50CT} mientras que si la inoculación es a través de las mucosas (vía vaginal, oral u ocular) la dosis mínima es de $10^{5.3}$ DI_{50CT} (Cafruny y Hovinen, 1988). En el caso del VSRRP, aunque se sabe que los cerdos son susceptibles por una gran variedad de rutas, aún no se han establecido las dosis infectantes mínimas necesarias para producir la infección. Sin embargo, los datos resultantes de los distintos trabajos parecen indicar que la dosis mínima en la inoculación intrauterina es muy superior a la dosis mínima en la intraperitoneal, ruta más frecuentemente utilizada para determinar la presencia del VSRRP en el semen de los verracos infectados cuando se utiliza una prueba biológica. Los resultados positivos obtenidos en nuestro estudio, y la discrepancia con los resultados obtenidos en otros trabajos, se pueden deber en gran medida a la alta dosis a la que fueron expuestas las cerdas, siendo posible que dosis mucho más bajas, y más próximas a las que se encuentran en el semen de forma natural, hubieran dado lugar a resultados muy distintos a los obtenidos.

3. El uso de semen diluido o semen puro. Su influencia se deriva directamente del factor anterior, ya que el uso de semen diluido introduce un factor de dilución también en el posible virus presente, disminuyendo por tanto la cantidad de virus y representando, como consecuencia, un riesgo menor que el semen sin diluir. Por otra parte, hay que tener en cuenta el posible efecto negativo que los diluyentes pueden tener sobre el virus. De lo anteriormente expuesto se puede deducir que el uso de la inseminación artificial disminuye el riesgo de infección por el VSRRP.

4. El tiempo transcurrido desde la infección del verraco hasta la utilización del semen para la cubrición, ya que éste determina la presencia o no de virus en el semen, cuya eliminación por esta vía está limitada en el tiempo.

5.2. Objetivo B: efecto que la infección por el VSRRP tiene en las cerdas en el primer tercio de la gestación

La infección de las cerdas utilizadas en este estudio por la cepa 5710 del VSRRP quedó demostrada por el aislamiento del virus a partir de distintas muestras recogidas de los animales en estudio y por la seroconversión que experimentaron los animales de forma bastante constante a partir del día 10 ó 15 p.i..

Nuestros resultados muestran que la sintomatología asociada a la infección por el VSRRP en las cerdas al inicio de la gestación es bastante similar a la descrita anteriormente para los verracos. En este sentido cabe que destacar que tampoco en este caso se observaron signos respiratorios en ninguno de los animales empleados para llevar a cabo el estudio, fuera cual fuera la vía de inoculación empleada. En cuanto a los signos de depresión y anorexia descritos por otros autores (Loula, 1991; Blackburn, 1991; Gordon, 1992, Hopper *et al.*, 1992; Terpstra *et al.*, 1991) sólo aparecieron en algunos de los animales de nuestro estudio, coincidiendo con los autores anteriormente mencionados en el hecho de que esta anorexia, o más bien inapetencia, cuando apareció fue de muy corta duración, presentándose fundamentalmente entre los días 1 y 3 p.i.. La presentación de estos signos parece tener un componente de respuesta individual a la infección muy fuerte, ya que animales inoculados con dosis semejantes de la misma cepa del VSRRP muestran una respuesta a la infección muy distinta, pudiendo pasar totalmente desapercibida en algunos casos, como ha sucedido en gran parte de las cerdas inoculadas con el VSRRP en los días 7, 14 ó 21 de gestación o dando lugar a una sintomatología notoria como la desarrollada por la cerda 14 del grupo de animales inoculados por la vía intravenosa en el momento de la cubrición, la cual mostró depresión y anorexia desde el día 2 hasta el día 10 p.i..

Por otra parte, la coloración cianótica que dio denominación, en su origen, a la enfermedad sólo se observó en 1 de los animales utilizados a lo largo del estudio. Este hecho concuerda con la observación de que su aparición raramente supera el 5% de los animales afectados (de Jong *et al.*, 1991a). Esta coloración cianótica apareció fundamentalmente en las orejas y, con menor intensidad, en el abdomen, zonas donde es más frecuente su presentación, y su duración fue de menos de 24 horas.

En cuanto a la pirexia, tanto en las cerdas expuestas al virus por la vía intrauterina como en las expuestas por la vía intranasal e intravenosa en el día 0 de gestación se observaron temperaturas ligeramente elevadas entre los días 1 y 10 p.i. en la mayoría de los animales en estudio. Estas temperaturas estuvieron en general en torno a los 40°C, superándose en raras ocasiones los 41°C. Sin embargo, cuando la inoculación se realizó en los días 7, 14 ó 21 de gestación sólo uno de los

Discusión

animales en estudio alcanzó temperaturas de alrededor de 40°C entre los días 1 y 14 p.i., siendo además en este mismo animal en el que se observó un mayor efecto de la infección por el VSRRP sobre los embriones. Estos resultados parecen indicar una vez más la existencia de un componente individual de respuesta a la infección importante.

Después de la inoculación de los animales, fue posible detectar el virus en el suero de los mismos de forma constante desde la primera extracción de sangre, realizada entre los días 3 y 5 p.i. según los casos, hasta los días 10 ó 15 p.i., siendo la mayoría de los animales negativos en el día 20 ó 21 p.i., con la única excepción de una cerda inoculada por las vías intranasal e intravenosa que fue positiva en el momento del sacrificio en el día 20 p.i.. Estos resultados son bastante similares a los obtenidos por Christianson *et al.* (1993), que describen una viremia de unos 9 días de duración en cerdas gestantes, Mengeling *et al.* (1995), que determinan la presencia del virus en muestras de suero hasta el día 14 p.i. y Wills *et al.* (1995) que consiguen aislar el virus en lechones inoculados experimentalmente desde el día 2 hasta el día 11 p.i. y, a partir de ahí, de forma intermitente hasta el día 23 p.i..

Además, fue posible determinar la presencia del VSRRP en algunos de los órganos recogidos en la necropsia de los animales, realizada 10 ó 20 días p.i.. La distribución orgánica observada es semejante a la que se produce en los verracos, siendo bastante constante su presencia fundamentalmente en el pulmón, las amígdalas y en los distintos ganglios linfáticos obtenidos en el momento del sacrificio. Sin embargo, destaca especialmente, por la importancia que este hecho pudiera tener sobre la reproducción, su presencia en algunas de las muestras de útero y en los ovarios de algunas de las cerdas en estudio. Nuestros resultados coinciden con los obtenidos por otros autores que han podido aislar el virus a partir de muestras de útero y placenta (Christianson *et al.*, 1993; Mengeling *et al.*, 1994) y de los ovarios (Swenson *et al.*, 1995a). A pesar de haber sido descrita la presencia del virus en los ovarios, no se conoce con exactitud cómo alcanza el virus esta localización, siendo probable que sea por diseminación hematógena o linfática, ya que la vascularización tan intensa del cuerpo luteo predispondría a su llegada durante la viremia. A pesar de todo, el efecto que pueda tener el virus en el ovario y en el ciclo estral es desconocido, sobre todo teniendo en cuenta que no parece afectar a la fertilización ya que se ha aislado tanto de cerdas gestantes como de cerdas vacías.

La viremia que se produce tras la infección no sólo hace que sea posible la distribución orgánica del VSRRP, sino que también da lugar a su eliminación por las distintas vías, y, aunque en este caso la eliminación fue muy esporádica y de corta duración, fue posible aislar el virus de algunos de los hisopos nasales y algunas de las muestras de heces obtenidas a lo largo del estudio, fundamentalmente entre los días 3 y 6 p.i..

En cuanto al efecto que la infección por el VSRRP pudiera tener sobre la reproducción, en nuestro estudio tuvimos en cuenta los distintos parámetros que pudieran verse afectados por el VSRRP. Los parámetros considerados fueron las tasas de concepción y fertilización, cuando la infección se realizó en el momento de la concepción, el efecto del virus sobre el desarrollo embrionario y la capacidad del virus para infectar a los embriones al comienzo de la gestación.

Para valorar el efecto que la infección por el VSRRP tiene sobre la tasa de concepción se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en dos de los estudios llevados a cabo: el realizado exponiendo a las cerdas por la vía intrauterina en el momento de la inseminación artificial y el realizado exponiendo a las cerdas por las vías intranasal e intravenosa en el día 0 de gestación. En el primero de ellos hay que destacar que, aunque fue posible demostrar la transmisión de la enfermedad a través de semen contaminado con el VSRRP, no se observó ningún efecto adverso sobre la tasa de concepción ya que si se comparan los resultados obtenidos en los dos grupos de cerdas expuestas al VSRRP, seronegativas y preinmunizadas, con los del grupo testigo se observa que el 85,7% de las cerdas seronegativas y el 71,4% de las cerdas preinmunizadas estaban gestantes en el momento del sacrificio frente al 100% en el grupo de las cerdas testigos. Estas diferencias no fueron estadísticamente significativas, estando los valores obtenidos en todos los grupos dentro de los valores normales en cerdas núlparas. Además, estos resultados concuerdan con los obtenidos por Lager *et al.* (1996b) y los obtenidos por Swenson *et al.* (1995), los cuales obtuvieron unas tasas de concepción del 66% y del 63% respectivamente en las cerdas inoculadas con el VSRRP por la vía intrauterina y del 50% y el 83% respectivamente en las cerdas que actuaron como testigos. En cuanto al segundo estudio, cuando se utilizaron las vías intranasal e intravenosa para inocular a las cerdas con el VSRRP en el día 0 de gestación, los resultados obtenidos fueron similares a los obtenidos en el caso de la exposición al VSRRP por la vía genital ya que el 83,3% de las cerdas del grupo infectado con el VSRRP estaban gestantes en el momento del sacrificio frente al 76,9% en el grupo de las cerdas testigos. Nuestros resultados, junto con los obtenidos por los autores anteriormente mencionados parecen indicar que la presencia del VSRRP en el momento de la concepción, bien sea por una exposición intrauterina o por una exposición intranasal e intravenosa no interfiere de forma significativa con la misma. Sin embargo, esta conclusión entra en contradicción con observaciones de campo (Keffaber, 1989; Hopper *et al.*, 1992) y evidencias epidemiológicas (Yaeger *et al.*, 1993) que indican una disminución en la fertilidad y un aumento en las repeticiones cíclicas en los brotes de SRRP o cuando se inseminan cerdas con verracos infectados con el virus. Estas diferencias se podrían deber una vez más a diferencias en la patogenicidad de las distintas cepas como ya ha quedado demostrado en inoculaciones experimentales llevadas a cabo al final de la gestación (Mengeling *et al.*, 1996d; Park *et al.*, 1996c).

El segundo parámetro valorado para determinar el efecto que la infección por el VSRRP tiene al comienzo de la gestación fue la tasa de fertilización. Para su estudio, de nuevo se tuvieron en cuenta los resultados obtenidos en los estudios llevados a cabo exponiendo a las cerdas por la vía intrauterina y por las vías intranasal e intravenosa. En ningún caso se observaron diferencias estadísticamente significativas en la relación embriones/cuerpos luteos entre las cerdas expuestas al VSRRP y sus testigos. En el caso de las cerdas expuestas por la vía intrauterina, la relación embriones/cuerpos luteos fue del 0,77, el 0,82 y el 0,78 para las cerdas seronegativas, preinmunizadas y testigos respectivamente. Cuando la inoculación se realizó por las vías intranasal e intravenosa los resultados obtenidos fueron también similares en las cerdas inoculadas con el VSRRP y en las testigos, siendo la relación del 0,69 y del 0,70 respectivamente para las cerdas sacrificadas en el día 10 p.i. y del 0,81 y el 0,78 respectivamente en el caso de las cerdas sacrificadas en el día 20 p.i... En consecuencia es posible deducir que la presencia del VSRRP en el momento de la fertilización no parece tener ningún efecto sobre la misma. En este sentido nuestros resultados están en concordancia con los obtenidos por otros autores (Gradil *et al.*, 1996b), los cuales no observaron diferencias en el tamaño medio de la camada en las cerdas infectadas y las testigos (9,7 y 9,2 fetos/camada respectivamente).

Aunque las tasas de fertilización en el cerdo suelen ser del 95% o superiores (Anderson, 1978), en nuestro estudio el número de embriones presentes en el útero sólo fue de aproximadamente un 80% del número de cuerpos luteos encontrados en los ovarios en las cerdas sacrificadas en el día 20 p.i. e incluso inferior en las cerdas sacrificadas en el día 10 p.i.. Sin embargo, este fenómeno se produjo en todos los grupos en estudio, siendo comparables las cifras obtenidas en las cerdas expuestas al VSRRP y en las no expuestas. Este hecho parece indicar que la pérdida de embriones observada no se produjo como consecuencia de la presencia del VSRRP sino que se debe a factores comunes a todos ellos, quizás a una degeneración normal de algunos de los ovocitos fecundados al comienzo el desarrollo embrionario por un proceso de bloqueo en el mismo. La pérdida de embriones fue especialmente marcada en las cerdas sacrificadas en el día 10 p.i., en las cuales se perdieron aproximadamente un 30% de los embriones que deberían estar presentes en el útero. Esta pérdida, aún superior a la hallada en las cerdas sacrificadas en el día 20 de gestación se pudo deber a dos factores. Por un lado a la influencia de los resultados individuales sobre el conjunto. De hecho, las tasas de recuperación tan bajas se vieron en gran medida influidas por las tasas de recuperación de 3 de las cerdas en estudio: la cerda número 28 y la número 40 del grupo de las expuestas al VSRRP y la cerda número 3 del grupo de las testigos para las cuales las tasas de recuperación fueron del 42%, el 44% y el 47% respectivamente. Por otro lado hay que destacar que los embriones de cerdo son difíciles de identificar y recoger cuando han eclosionado de la zona pellucida, de forma que es posible que, por un lado algunos de los embriones no hayan

sido arrastrados en los lavados realizados a los cuernos uterinos y por otro lado que hayamos perdido algunos de ellos, aún estando presentes, al no haberlos identificado adecuadamente.

Una vez valoradas las tasas de concepción y de fertilización, el tercer parámetro a tener en cuenta a la hora de estudiar el posible efecto del VSRRP al comienzo de la gestación es su efecto en el desarrollo embrionario. De hecho, se sabe que algunos virus porcinos como el PVP o el virus de la enfermedad de Aujeszky, aunque no afectan a la concepción, son capaces de producir alteraciones en el ulterior desarrollo de esos embriones tanto *in vivo* como *in vitro* (Bolin y Bolin, 1984; Bane *et al.*, 1990). En nuestro estudio, se tuvieron en cuenta para valorar este parámetro los resultados obtenidos en las cerdas inseminadas con semen contaminado con el VSRRP, en aquellas inoculadas por las vías intranasal e intravenosa en el momento de la cubrición y en las inoculadas por la vía intranasal en los días 7, 14 y 21 de gestación. Además, los resultados se completaron con un estudio realizado *in vitro* utilizando embriones antes de la implantación. Los resultados obtenidos de cada uno de estos estudios se discuten a continuación.

El grado de desarrollo alcanzado por los embriones en el día 10 de gestación cuando la inoculación se realizó por las vías intranasal e intravenosa fue superior en el caso de las cerdas expuestas al VSRRP al alcanzado por los embriones de las cerdas testigos. El número anormalmente alto de embriones que estaban sufriendo un proceso de degeneración en este último grupo se debió en gran medida al efecto que sobre el conjunto produjeron los resultados de la cerda número 12, la cual presentó un número muy alto de embriones que habían sufrido un proceso de bloqueo en el estadio de 2 células. Aunque las razones de este bloqueo no pudieron ser determinadas, bloqueos similares se han descrito cuando se mantienen los embriones *in vitro*, indicando que posiblemente sea un momento especialmente delicado en el desarrollo inicial de los mismos. En cualquier caso, no es posible adscribirlo al efecto del VSRRP ya que no fue posible determinar la infección de la cerda. Como consecuencia se puede concluir en función de los resultados aquí expuestos que la presencia del VSRRP no inhibe significativamente el desarrollo embrionario en los primeros momentos del mismo. Además, los resultados obtenidos *in vitro* apoyan esta teoría ya que el grado de desarrollo alcanzado por los embriones después de 72 horas de cultivo en presencia de grandes cantidades del VSRRP o tras la microinyección con el mismo fue similar al alcanzado por los embriones que actuaron como testigos.

Cuando el grado de desarrollo alcanzado por los embriones se valoró en el día 20 ó 21 p.i. se observó que aunque los embriones se habían implantado normalmente y habían comenzado la organogénesis, el número de embriones muertos era superior en todos los casos en los grupos de cerdas expuestas al VSRRP, fuera cual fuera la vía por la que habían sido expuestas al virus. Así, cuando la exposición había sido por la vía intrauterina el número de embriones muertos fue 2 y 4

Discusión

veces superior en los grupos de las cerdas seronegativas y preinmunizadas que en las cerdas del grupo testigo, siendo las diferencias existentes entre ellos estadísticamente significativas. En el grupo de las cerdas expuestas al VSRRP por las vías intranasal e intravenosa en el día 0 de gestación el número de embriones muertos presentes en las cerdas del grupo expuesto al VSRRP fue 3 veces superior al encontrado en el grupo de las testigos, siendo además una cifra muy llamativa ya que representaban el 35,4% de los embriones presentes. Al igual que había sucedido en el caso anterior las diferencias fueron estadísticamente significativas. Cuando la inoculación se realizó en los días 7, 14 y 21 de gestación el número de embriones muertos, también fue superior en los grupos de cerdas expuestas al virus que los grupos testigos, aunque en este caso sólo ligeramente cuando se consideraron en su conjunto los resultados. Sin embargo, considerados por separado, las diferencias fueron especialmente marcadas en los grupos inoculados en el día 14 de gestación, en los cuales el número de embriones muertos fue el doble en el grupo de las expuestas al VSRRP que en el grupo de las testigos, debido al efecto que sobre el conjunto causó el alto número de embriones muertos encontrados en una de las cerdas, destacando además que ésta fue la cerda que había presentado una sintomatología más manifiesta y la que mayor número de embriones infectados presentó.

El aumento significativo en el número de embriones muertos observado en nuestro estudio no se ha producido en otros estudios llevados a cabo. Por el contrario sólo se ha podido establecer un claro efecto del VSRRP sobre los fetos al final de la gestación (Christianson *et al.*, 1993; Mengeling *et al.*, 1994), detectándose con anterioridad únicamente en embriones vivos. Así, durante la primera mitad de la gestación el virus parece replicarse durante un periodo de al menos 31 días sin que existen cambios macroscópicos apreciables en los fetos (Christianson *et al.*, 1993; Lager y Ackermann, 1994; Lager y Mengeling, 1995), siendo posible obtener fetos o lechones al parto con una apariencia normal tras la inoculación de la cerda con el VSRRP en el momento de la cubrición (Gradil *et al.*, 1996b). Los resultados anteriormente mencionados han llevado a establecer la hipótesis de que, aunque el virus pueda infectar a los embriones desde el comienzo de la gestación, éste carece de capacidad para provocar la muerte de los mismos hasta el final de la misma. Incluso se ha especulado con la posibilidad de que los fetos sufran un cambio en el desarrollo entre los días 65 y 70 de gestación que los haga pasar de soportar la replicación vírica sin efectos aparentes en su viabilidad a morir como consecuencia de la infección. Desconocemos cuál es la causa que ha producido una mortalidad embrionaria tan alta en nuestro estudio, sin embargo todo parece indicar que se debe a un efecto directo del virus sobre los embriones ya que por un lado no se observó ninguna diferencia entre los distintos grupos en el desarrollo embrionario antes de la implantación, momento en el que tampoco se pudo demostrar la infección de los embriones por el VSRRP y por otro lado, un mayor número de embriones muertos fue acompañado normalmente de un mayor porcentaje de embriones infectados.

Otro de los objetivos de nuestro estudio fue estudiar la susceptibilidad de los embriones a la infección por el VSRRP al comienzo de la gestación. Para ello dividimos el estudio en dos partes, considerando por un lado el efecto que el VSRRP pudiera tener antes de que se produzca la implantación y por otro el efecto que pudiera tener después de la misma. De esta forma, la susceptibilidad antes de la implantación se estudió *in vitro* e *in vivo*, sacrificando cerdas inoculadas en el día de la cubrición por las vías intranasal e intravenosa a los 10 días del comienzo de la gestación. Los resultados obtenidos *in vitro* indican que no es posible recuperar el VSRRP de los embriones incubados en un medio de cultivo en el cual se habían añadido grandes cantidades del VSRRP. De igual forma, cuando se intentó aislar el VSRRP de los embriones de 10 días recuperados de las cerdas expuestas al virus en el día de la cubrición se obtuvieron resultados negativos en todos los casos. Estos resultados negativos se pueden deber a varias razones. Una de ellas sería la posibilidad de que los embriones al comienzo de la gestación estén protegidos por la *zona pellucida*, la cual actuaría como una barrera impidiendo la penetración del VSRRP y, por tanto, la infección de los blastómeros. Esto mismo sucede con la mayoría de los virus que afectan al cerdo (Bolin *et al.*, 1983; Singh *et al.*, 1984; Singh y Thomas, 1987a,b; Dulac y Singh, 1988) ya que sólo en el caso del PVP se ha conseguido demostrar que el virus atraviese la *zona pellucida* y se multiplique en los blastómeros (Bane *et al.*, 1990). Sin embargo, tienen que existir otros factores que expliquen la ausencia del VSRRP una vez que los embriones han eclosionado de la *zona pellucida*. En el estudio realizado *in vitro* una posible explicación sería la inactivación del virus al estar mantenido durante un periodo de tiempo muy largo a 37°C sin una célula adecuada para su multiplicación. De hecho se sabe que se produce una reducción de 5 log en el título vírico después de una incubación de 48 horas a 37°C (Bloemraad *et al.*, 1994). En cuanto al estudio realizado *in vivo*, uno de los factores que podría explicarlo sería la ausencia del VSRRP en la luz del útero en el momento en que los embriones eclosionan de la *zona pellucida*, la cual quedó puesta de manifiesto por el hecho de que, aunque dos de las muestras de útero obtenidas en el momento del sacrificio fueron positivas al aislamiento del virus, ninguno de los líquidos de lavado utilizados para arrastrar los embriones fuera de la luz del útero lo fue. Sin embargo, la ausencia del virus en el entorno del embrión cuando éste eclosiona de la *zona pellucida* no puede explicar los resultados negativos al aislamiento vírico obtenido en los embriones que fueron microinyectados con entre 10 y 20 DI_{50CT} del VSRRP. Estos resultados parecen indicar que los blastómeros indiferenciados de los embriones al comienzo de la gestación pueden no ser una población celular adecuada para la multiplicación del virus, de forma que sea necesario que se produzca un proceso de diferenciación que dé lugar a la aparición de una población celular adecuada. Sin embargo, aunque esta teoría puede ser cierta, debe ser tomada con precaución ya que también hay que tener en cuenta en este periodo del desarrollo embrionario que existe la posibilidad de que las técnicas empleadas no tengan la sensibilidad suficiente para detectar la cantidad tan baja de virus que pudiera estar

presente en los embriones, tanto en el caso de aquellos recuperados en el día 10 de gestación como en el caso de los embriones microinyectados y estudiados al cabo de 72 horas de incubación *in vitro*. Hay que destacar en este sentido que las diluciones del virus inoculadas en los cultivos de MAP para determinar la sensibilidad de cada uno de los lotes utilizados dieron como resultado que la técnica era lo suficientemente sensible como para detectar al menos 100 DI₅₀CT/mL, mientras que la detección de cantidades menores del virus dependió en gran medida del lote de MAP utilizado. En cuanto a la técnica de RT-PCR utilizada, presenta una sensibilidad similar a la del aislamiento vírico ya que el límite de detección con muestras biológicas es de 100 DI₅₀CT. Esto explicaría el hecho de que no fuera posible detectarlas entre 10 y 20 DI₅₀CT microinyectadas en los embriones. Además, en el caso de que los embriones no hubieran sido susceptibles a la infección por el virus, es probable que éste se hubiera inactivado después de 72 horas a 37°C. Esta misma inactivación explicaría la ausencia de virus en el medio de cultivo en el que fueron mantenidos los embriones *in vitro* así como del medio utilizado para lavar los embriones antes de proceder al intento de aislamiento vírico, unido, en este último caso, al factor de dilución sobre el posible virus presente que introducen los lavados, que fue estimado en 1/100 para cada uno de ellos.

Aunque no se conocen las causas por las cuales, aparentemente, los embriones no son susceptibles a la infección por el VSRRP el bloqueo se debe haber producido de forma temprana en el ciclo de replicación del virus, ya que no se detectaron proteínas víricas por la técnica de inmunofluorescencia en los embriones cultivados *in vitro*. La causa puede ser la ausencia de un receptor para la adsorción y penetración del virus o bien la incapacidad del virus para perder la envoltura y empezar la replicación. De esta forma, se sabe que los embriones de ratón en el estadio de 2 células carecen de receptores para el virus del polio, mientras que en el estadio de blastocisto el virus se puede adsorber y penetrar en la membrana de los blastómeros (Biczysko *et al.*, 1973). Este mismo fenómeno podría suceder en el caso del VSRRP, siendo necesario esperar a momentos más avanzados del desarrollo embrionario para que el embrión sea susceptible al mismo.

Por el contrario, cuando se estudiaron embriones de 20 ó más días fue posible demostrar la existencia de una infección transplacentaria, fuera cual fuera la vía de inoculación por la que había sido expuesta la cerda al VSRRP.

Así, cuando la exposición al virus se realizó por la vía intrauterina en el inicio de la gestación, el 83% de las camadas de las cerdas seronegativas y el 20% de las camadas de las cerdas preinmunizadas presentaron al menos uno de sus embriones infectados con el VSRRP, cuando la exposición se realizó por las vías intranasal e intravenosa en el día 0 de gestación el porcentaje de

camadas infectadas fue del 60% y, por último, cuando la exposición al VSRRP se realizó por la vía intranasal en los días 7, 14 ó 21 de gestación no fue posible detectar ninguna camada infectada en las cerdas expuestas en los días 7 y 21 de gestación mientras que en el día 14 de gestación el 40% de las camadas estaban infectadas. Estos resultados son similares a los obtenidos en otros estudios, los cuales han demostrado que el porcentaje de camadas infectadas al comienzo de la gestación puede llegar hasta cifras próximas al 80% (Lager *et al.*, 1994). Además variaciones importantes en el porcentaje de camadas infectadas, tal como hemos encontrado en nuestro estudio, también han sido descritas por otros autores (Mengeling *et al.*, 1994). En cuanto al porcentaje de embriones infectados, éste osciló entre el 0% en el caso de las cerdas inoculadas en los días 7 y 21 de gestación y el 16% en el caso de las cerdas expuestas por las vías intranasal e intravenosa en el día 0 de gestación. Estas cifras parecen estar en consonancia con las obtenidas por otros autores al comienzo y la mitad de la gestación (Christianson *et al.*, 1993; Mengeling *et al.*, 1994; Lager *et al.*, 1996a), habiéndose observado además que la incidencia de infección transplacentaria aumenta al avanzar la gestación siendo muy elevada cuando la infección sucede al final de la misma (Terpstra *et al.*, 1991; Christianson *et al.*, 1992; Plana *et al.*, 1992; Mengeling *et al.*, 1994; Lager *et al.*, 1996a). Es posible que las diferencias en la extensión de la infección transplacentaria se deban a la estructura de la placenta, la cual hace más difícil el acceso del virus a los embriones al comienzo de la gestación ya que a medida que la gestación avanza y se desarrolla paralelamente todo el soporte vascular de la placenta y del feto, éste va adoptando posiciones subepiteliales, invadiendo los capilares embrionarios los trofoblastos. Como consecuencia de ello la relación materno-fetal se hace más íntima, haciendo más eficiente el intercambio a medida que avanza la gestación, aumentando de esta manera las probabilidades de infección transplacentaria. Otra posibilidad sugerida para explicar estas diferencias en el porcentaje de embriones infectados en los distintos momentos de la gestación sería la relativa capacidad del embrión o feto para soportar la replicación del virus (Mengeling *et al.*, 1994). Sin embargo, la primera teoría parece más probable ya que se ha demostrado que cuando la inoculación de los fetos es intraamniótica o intramuscular el virus se puede replicar en los mismos (Christianson *et al.*, 1993; Lager y Mengeling, 1995).

Lo que sí parece probable en función de los resultados obtenidos en nuestros estudios es el hecho de que los embriones no se infectan por el VSRRP hasta que tiene lugar la placentación, entre los días 14 y 20 de gestación, con el consiguiente establecimiento de una relación directa entre la madre y el embrión. Aunque no se conoce el mecanismo patogénico del VSRRP, los virus patógenos normalmente atraviesan la barrera placentaria bien como virus libre o bien unidos a células maternas. Por tanto, es muy probable que el virus alcance los embriones, bien de forma libre o bien vehiculado en macrófagos, tal como se ha descrito en otros órganos, después de que se haya establecido la unión materno-filial y exista por tanto un intercambio entre la madre y los embriones. Una vez en el lado fetal de la barrera placentaria el virus puede infectar los tejidos

Discusión

placentarios o entrar a la vasculatura y/o el amnios y de esta forma llegar al feto. Si éste fuera el mecanismo de infección estaría en concordancia con el hecho de que el porcentaje de infección transplacentaria aumente al avanzar la gestación al existir un mayor intercambio y un contacto más directo entre la madre y el embrión.

En cuanto a la forma de difusión del virus entre los embriones, ésta puede ser por extensión intrauterina de la infección, extendiéndose por tanto a los embriones adyacentes, como sucede en el caso del PVP o bien por infección transplacentaria directa. La posición que ocupaban los embriones infectados en nuestro estudio nos hace pensar que la infección de los mismos es transplacentaria y no por difusión intrauterina. Además, el que suceda así está en consonancia con la teoría de que el virus llega al embrión directamente de su madre una vez establecido un contacto directo entre ambos.

Por otra parte el hecho de que el virus se haya aislado fundamentalmente de embriones vivos puede deberse, además de a la resistencia de los embriones para soportar la replicación vírica descrita por algunos autores, a que el tiempo transcurrido desde que se infectaron hasta que se sacrificaron las cerdas no fue suficiente para producir un efecto patógeno claro. Esta segunda posibilidad quedaría apoyada en nuestro estudio por el hecho de que en la mayoría de los casos las cerdas que presentan un mayor número de embriones muertos son a su vez las que presentan un mayor número de embriones positivos al VSRRP.

En cuanto a la eficacia de la vacuna para prevenir los problemas asociados a la reproducción, hay que tener en cuenta que aunque a primera vista parece que la incidencia de infección transplacentaria fue mucho menor en el grupo de las cerdas preinmunizadas que en el grupo de las cerdas seronegativas, el número de animales empleado fue muy bajo y no permite establecer conclusiones acerca del posible papel protector de la vacuna, pudiendo deberse las diferencias al azar ya que no quedaron apoyadas estadísticamente. Por otra parte, el número tan anormalmente alto de embriones muertos en el grupo de las cerdas preinmunizadas no preconiza una eficacia adecuada de la vacuna. De hecho, la muerte de los embriones se podría haber debido al efecto del VSRRP sobre los mismos, ya que, aunque no fue posible aislar el virus de ninguno de los embriones muertos, parece probable que el porcentaje de infección de los mismos fuera alto, causando como consecuencia la muerte de los embriones y sufriendo posteriormente, al comenzar los fenómenos de autólisis, un proceso de inactivación que es bastante rápido en los virus ARN, haciendo como consecuencia imposible su aislamiento.

Por otra parte, llama la atención la prácticamente total ausencia de anticuerpos tras la vacunación de las cerdas preinmunizadas. Se podría pensar que los resultados obtenidos en este

grupo, similares a los obtenidos en cerdas no vacunadas, se podrían explicar por la ausencia de anticuerpos específicos en la mayoría de las cerdas vacunadas. Sin embargo, la única cerda que desarrolló anticuerpos detectables tras la vacunación presentó una respuesta similar a las cerdas seronegativas, con una sintomatología similar al resto y, además, su camada contenía el único embrión infectado encontrado en este grupo.

En resumen, los resultados de nuestro estudio indican que es posible que se produzca la infección de los embriones al comienzo de la gestación. Este hecho tiene algunas implicaciones ya que como consecuencia de la infección se puede producir la muerte de algunos de los embriones, dando lugar a la aparición de cerdas con un tamaño de camada bajo, o de todos ellos, dando lugar en este caso a repeticiones acíclicas tras la reabsorción de los embriones. En este sentido hay que tener en cuenta que, aunque en nuestro estudio no se han producido abortos y la mayoría de las gestaciones avanzaban normalmente en el momento del sacrificio de los animales, prácticamente en todos los casos éste se llevó a cabo alrededor del día 21 p.i.. Esto significa que si el tiempo necesario para que se produzca la muerte y la reabsorción de los embriones infectados es mayor, lo cual parece bastante probable en función de los resultados obtenidos, hubiera sido posible detectar repeticiones acíclicas o incluso expulsiones embrionarias, es decir, hubiera aparecido un fallo reproductivo más claro si se hubieran dejado continuar las gestaciones. De hecho, una de las cerdas preinmunizadas inseminadas con semen que contenía el VSRRP presentó todos sus embriones en un avanzado estado de reabsorción. En este caso concreto, si se hubiera permitido que la gestación continuara se habría producido una repetición acíclica con toda seguridad. Esta teoría estaría apoyada por los resultados obtenidos por Lager *et al.* (1994), los cuales observaron que cuando la inoculación de las cerdas se realiza en el día 30 de gestación, se produce un fallo reproductivo importante, abortando una tercera parte de los animales antes del día 50 de gestación. Sin embargo, estos mismos autores no han podido determinar la existencia de ningún efecto adverso cuando las cerdas se inoculaban en el día 1 de gestación ya que todas presentaban fetos normales en el día 111 de gestación.

A pesar de que el papel del VSRRP en la producción de un fallo reproductivo al final de la gestación está suficientemente probado, el papel que pueda tener en la infertilidad puede ser muy limitado, en vista de los resultados aquí presentados. En cualquier caso, los mecanismos que pueden estar implicados en un posible efecto en las tasas de concepción y el posterior mantenimiento de la gestación son los siguientes:

- 1.- La cepa del virus con la que trabajemos, al haberse descrito, como ya se ha mencionado anteriormente, diferencias antigénicas y de patogenicidad muy importantes entre ellas.

2.- La espermatogénesis y la capacidad de los espermatozoides para fertilizar los óvulos. Respecto a este punto ya se ha comentado el posible efecto que la infección por el VSRRP puede tener sobre la calidad espermática. Sin embargo, no existe ningún trabajo en la actualidad que estudie la capacidad de fertilización de los espermatozoides procedentes de verracos infectados con el VSRRP.

3.- Fertilidad de los óvulos. Ésta no parece estar afectada por el VSRRP si tenemos en cuenta los resultados obtenidos en nuestro estudio. Aún así no se puede descartar un posible efecto sobre la misma en el caso de que el VSRRP estuviera presente en el ovario durante el desarrollo folicular, pudiendo interferir de alguna forma en el desarrollo normal de los oocitos.

4.- Desarrollo de los cigotos, el cual puede estar modificado por el efecto directo del virus en los mismos o por cambios en el entorno uterino. En este sentido se sabe que existen otros agentes infecciosos que pueden tener un efecto sobre el desarrollo de los cigotos. Es el caso del virus de la rinotraqueitis infecciosa bovina y el virus de la enfermedad de Aujeszky, los cuales pueden dar lugar a la aparición de endometritis (Kendrick y McEntee, 1967; Bolin *et al.*, 1985) o el del virus de la diarrea infecciosa bovina que puede interferir con la fertilización y posterior desarrollo de los embriones (Grahm *et al.*, 1984) y el PVP que puede interferir con el desarrollo de los embriones (Wrathall y Mengeling, 1979). En el caso del VSRRP, éste no parece tener ningún efecto en el desarrollo de los embriones hasta que se produce la implantación, siendo capaz de infectarlos a partir de este momento y posiblemente de dar lugar posteriormente a la muerte de los mismos.

VI. CONCLUSIONES

Conclusiones

Dado que nuestro estudio se ha dividido en dos áreas bien diferenciadas, hemos creído oportuno dividir las conclusiones que del mismo se derivan en estas mismas áreas a fin de separar ambas cuestiones en los dos apartados independientes que constituyen.

A. Conclusiones del estudio del efecto de la infección por el VSRRP en el verraco

1. La infección de verracos adultos con el VSRRP da lugar a una respuesta clínica variable, existiendo animales en los que pasa totalmente desapercibida y dando lugar a la aparición de una sintomatología que, en general, no es muy marcada en otros, debido a un componente de respuesta individual muy importante.
2. La infección por el VSRRP da lugar a alteraciones en la calidad espermática que se manifiestan fundamentalmente como una disminución en el porcentaje de espermatozoides móviles, una disminución en el porcentaje de espermatozoides con acrosoma normal y un aumento en el porcentaje de espermatozoides con gotas citoplasmáticas. Sin embargo, estas alteraciones no se presentan de forma constante en todos los animales.
3. Dentro de los límites de nuestro sistema de detección no podemos afirmar de forma concluyente que el VSRRP se elimine sistemáticamente por el semen de los verracos infectados. Aún así, su presencia en esta localización es posible, aunque probablemente en bajas cantidades.
4. Tras la inoculación de animales adultos con el VSRRP la distribución del virus por el organismo es muy alta, pudiendo encontrarse en prácticamente todos los órganos mientras dura la viremia. Esta distribución da lugar a la llegada del virus a determinados órganos del aparato reproductor, destacando como localización donde su presencia es más frecuente el epidídimo. Posteriormente el virus tiene la capacidad de acantonarse en determinados órganos, fundamentalmente en los pulmones, las amígdalas y algunos ganglios linfáticos. Además, al menos durante el periodo de viremia, el VSRRP se elimina por la mayoría de las vías naturales en los animales infectados, pudiendo encontrarse, aunque en baja proporción, en las secreciones nasales, oro-faríngeas y prepuciales, en las heces y en la orina, siendo mayor su eliminación por las heces y las secreciones nasales.
5. La presencia del VSRRP en el semen puede dar lugar a la transmisión de la enfermedad por la vía venerea en cerdas nulíparas, tanto en las que son seronegativas como en aquellas previamente

Conclusiones

vacunadas con la vacuna inactivada Cyblue®.

6. La presencia del VSRRP en el semen no interfiere con la concepción ni con la fertilización de los ovocitos en las cerdas nulíparas expuestas a ese semen.

B. Conclusiones del efecto de la infección por el VSRRP en las hembras al comienzo de la gestación

1. La infección por el VSRRP en las cerdas, al igual que sucede en los verracos, no da lugar a la presentación de una sintomatología característica, pudiendo pasar clínicamente desapercibida o dar lugar a una respuesta inespecífica de intensidad y duración variable debido a que presenta un componente de respuesta individual muy importante.

2. La inoculación de cerdas nulíparas con el VSRRP en el momento de la cubrición no produce ningún efecto apreciable sobre las tasas de concepción y fertilización.

3. La presencia del VSRRP no interfiere con el desarrollo embrionario, al menos hasta el estadio de blastocisto eclosionado. Sin embargo, posteriormente, su presencia se asocia con un número anormalmente alto de embriones muertos/camada, sin que se pueda afirmar de forma concluyente que el virus haya sido la causa de su muerte ya que sólo se aísla de estos embriones en algunas ocasiones.

4. Los embriones en estadio de mórula y blastocisto, tanto antes como después de la eclosión de la *zona pellucida*, no parecen ser susceptibles a la infección por el VSRRP. Sin embargo, una vez que se produce la implantación, entre los días 14 y 20 de gestación el VSRRP adquiere la capacidad de atravesar la barrera placentaria, provocando como consecuencia la infección de los embriones, al menos desde este momento del desarrollo.

5. El VSRRP no tiene capacidad de adhesión y/o penetración a la *zona pellucida*, estando por tanto los embriones protegidos de la infección por este virus al menos hasta que se produce la eclosión de la misma alrededor del día 7 de gestación.

VII. BIBLIOGRAFÍA

Bibliografia

- Abbas, A.K.; Lichtman, A.H.; Pober, J.S. (1994). Antigen processing and presentation to T lymphocytes. In: *Cellular and molecular immunology*. Ed. Abbas A.K., Lichtman, A.H. and Pober, J.S.. WB. Saunders, Philadelphia, PA, USA. pp. 115-135.
- Ahl, R.; Pensaert, M.; Robertson, I.B.; Terpstra, C.; van der Sande, W.; Walker, K.J.; White, M.E.; Meredith, M. (1992). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS or blue-eared pig disease). *Vet. Rec.*, 130: 87-89.
- Albina, E.; Baron, T.; Leforban, Y. (1992a). Blue-eared pig disease in Brittany. *Vet. Rec.*, 130: 58-59.
- Albina, E.; Baron, T.; Leforban, Y.; Plana Durán, J. (1992b). Blue-eared pig disease in Brittany: a new test. *Vet. Rec.*, 130: 83-84.
- Albina, E.; Benfield, D.A.; Haas, B. (1992c). PDIC discussion document 2: Survival of PRRS viruses outside of the host. In: *Pig Disease Information Centre*, University of Cambridge, Cambridge, UK. pp. 1-3.
- Albina, E.; Buffereau, J.Ph. (1993). Développement et utilisation d'une épreuve immuno-enzymatique pour le diagnostic courant du syndrome dysgénésique et respiratoire du porc. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 12 (2): 523-535.
- Albina, E.; Kobisch, M.; Cariolet, R.; Morvan, P.; Kéranflec'h, A.; Beaurepaire, B.; Hutet, E.; Labbé, A. (1995). Le syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP): Étude expérimentale des effets de l'infection sur la réponse immunitaire et la résistance aux infections *Aujeszky* et *Mycoplasma hyopneumoniae* chez le porc en croissance. *Journées Rech. Porcine en France*, 27:107-116.
- Albina, E.; Leforban, Y.; Baron, T.; Plana Durán, J.; Vannier, P. (1992c). An enzyme linked immunosorbent assay (ELISA) for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Ann. Rech. Vet.*, 23: 167-176.
- Albina, E.; Madec, F.; Cariolet, R.; Torrison, J. (1994). Immune response and persistence of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in infected pigs and farm units. *Vet. Rec.*, 134: 567-573.

Bibliografía

- Albina, E.; Madec, F.; Vannier, P. (1992d). Syndrome dysgénésique et respiratoire du porc (SDRP) (PRRS-maladie mystérieuse). *Journées Rech. Porcine en France*, 24: 115-126.
- van Alstine, W.G. (1991). Mystery swine disease in the United States. In: *European Comm. Seminar on the New Pig Dis.*, Bruselas, Bélgica. cap. 13.
- van Alstine, W.G.; Kanitz, C.L.; Stevenson, G.W. (1993). Time and temperature survivability of PRRS virus in serum and tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5: 621-622.
- van Alstine, W.G.; Stevenson, G.W.; Kanitz, C.L. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus does not exacerbate *Mycoplasma hyopneumoniae* infection in young pigs. *Vet. Microbiol.*, 49: 297-303.
- Andersen, K. (1974). Morphological abnormalities in the acrosome and nucleus of boar spermatozoa. *Nord. Vet. Med.*, 26: 215-217.
- Anderson, L.L. (1978). Growth, protein content and distribution of early porcine embryos. *Anat. Rec.*, 190: 143-153.
- Anelli, J. (1992). Swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) in North America. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 28-29.
- Bane, D.P.; James, J.E.; Gradil, C.M.; Molitor, T.W. (1990). *In vitro* exposure of preimplantation porcine embryos to porcine parvovirus. *Theriogenology*, 3: 553-561.
- Bane, D.; Neumann, E.; Hall, W.; Harlin, K.; Slife, L. (1992). PRRS associated with Fumosis contamination of feed. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 22-23.
- Bane, A.; Nicander, L. (1966). Electron and light microscopical studies on spermateliosis in a boar with acrosome abnormalities. *J. Reprod. Fertil.*, 11: 133-138.
- Baron, T.; Albina, E.; Leforban, Y.; Madec, F.; Guilmoto, H.; Plana Durán, J.; Vannier, P. (1992). Report on the first outbreaks of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in France. Diagnosis and viral isolation. *Ann. Reuch. Vét.*, 23: 161-166.

Bibliografía

- Bautista, E.; Choi, C.; Ayad, S.; Goyal, S.; Murtaugh, M.; Molitor, T. (1994). Antigenic diversity within porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus isolates. In: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Tailandia. p. 63.
- Bautista, E.M.; Goyal, S.M.; Collins, J.E. (1993a). Serologic survey for Lelystad and VR-2332 strains of porcine respiratory and reproductive syndrome (PRRS) virus in US swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5: 612-614.
- Bautista, E.M.; Goyal, S.M.; Yoon, I.J.; Joo, H.S.; Collins, J.E. (1993b). Comparison of porcine alveolar macrophages and CL-2621 for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus and anti-PRRS antibody. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5: 163-165.
- Bautista, E.M.; Meulenbergh, J.J.M.; Choi, C.S.; Molitor, T.W. (1996a). Structural polypeptides of the american (VR-2332) strain of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.*, 141: 1357-1365.
- Bautista, E.M.; Meulenbergh, J.J.M.; Choi, C.S.; Molitor, T.W. (1996b). PRRSV-specific T cell responses in infected and vaccinated pigs. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 63.
- Baysinger, A.K.; Dewey, C.E.; Straw, B.E.; Brumm, M.C.; Schmitz, J.A. (1997). Risk factors associated with endemic porcine reproductive and respiratory syndrome in swine breeding herds. In: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 447-449.
- Beilage, E.; Beilage, T. (1992). Epidemiological investigations into PEARs in Germany. In : *Proc. 12th IPVS Congress*, La Haya, Holanda. p. 125.
- Beilage, E.; Beilage, T.; Ohlinger, V.; Pearson, J.; Blaha, T. (1992). Comparative study on the detection of antibodies against the PRRS virus in german breeding and fattening pigs. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 37.
- Benfield, D.A.; Christopher-Hennings, J.; Nelson, E.A.; Nelson, J.; Yaeger, M.; Chase, C.C.L.; Swenson, S.; Zimmerman, J. (1995). Acute and chronic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the boar. In: *GA. Young Swine Conf.*, pp. 127-132.

Bibliografía

-Benfield, D.A.; Christopher-Hennings, J.; Nelson, E.A.; Rowland, R.R.R.; Chase, C.C.L.; Nelson, J.K.; Rossow, K.D. Current research on the effects of PRRSV in breeding age pigs. In: *Proc. AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp. 84-88.

-Benfield, D.A.; Christopher-Hennings, J.; Nelson, E.A.; Rowland, R.R.R.; Nelson, J.K.; Chase, C.C.L.; Rossow, K.D. (1997). Persistent fetal infection of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. In: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 455-458.

-Benfield, D.; Harris, L.; Nelson, E.; Christopher-Hennings, J.; Collins, J.; Chladek, D.; Christianson, W.; Morrison, R.; Gorcyca, D. (1992a). Properties of SIRS isolate ATCC VR-2332 in the United States and preliminary characterization of a monoclonal antibody to this virus. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsletter*, 4: 19-21.

-Benfield, D.A.; Nelson, E.; Collins, J.E.; Harris, L.; Goyal, S.M.; Robison, D.; Christianson, W.T.; Morrison, R.B.; Gorcyca, D.; Chladek, D. (1992b). Characterization of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus (isolate ATCC VR-2332). *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4: 127-133.

-Benfield, D.A.; Nelson, E.; Christopher-Hennings, J. (1994). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viral proteins and antigenic variation. In: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Tailandia. p. 62.

-Biczysko, W.; Soter, D.; Pienkowski, M.; Koprowski, H. (1973) Interactions of early mouse embryos with oncogenic viruses-simian virus 40 and polyoma. I. Ultrastructural studies. *Natl. Cancer Inst.*, 51: 1945-1954.

-Bilodeau, R.; Archambault, D.; Vézina, S.A.; Sauvageau, R.; Fournier, M.; Dea, S. (1994). Persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in a swine operation. *Can. J. Vet. Res.*, 58: 291-298.

-Bilodeau, R.; Dea, S.; Sauvageau, R.A.; Martineau, G.P. (1991). Porcine reproductive and respiratory syndrome in Québec. *Vet. Rec.*, 129: 102-103.

Bibliografía

- Biront, P.; Bonte, P. (1983). Porcine parvovirus (PPV): infection in boars. I. Possibility of genital localization in the boar after oronasal infection. *Zentralbl. Veterinarmed(B)*, 30: 541-545.
- Blackburn, P.W. (1991). PRRS - The impact of the disease on the pig industry - The experience of veterinary practice in the UK. In: *European Comm. Seminar on PRRS.*, Bruselas, Bélgica. cap. 15.
- Blaha, T. (1992). Epidemiological investigations into PEARS in Germany: consequences in fattening pigs. In: *Proc. 12th IPVS Congress*, La Haya, Holanda. p. 126.
- Blaha, T. (1995). Update on porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Swine Health Prod.*, 3: 263-265.
- Blaha, T.; Büker, E. (1995). Risk factors for the spread and the severity of PRRS. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhage, Dinamarca. p. 51.
- Bloemraad, M.; de Kluijver, E.P.; Petersen, A.; Burkhardt, G.E.; Wensvoort, G. (1994). Porcine reproductive and respiratory syndrome: temperature and pH stability of Lelystad virus and its survival in tissue specimens from viraemic pigs. *Vet. Microbiol.*, 42: 361-371.
- Boeckman, S. (1993). The quest for more quicker and easier diagnosis. *Swine Pract.*, mayo: 4-9.
- Bolin, C.A.; Bolin, S.R.; Kluge, J.P.; Mengeling, W.L. (1985). Pathologic effects of intrauterine deposition of pseudorabies virus on the reproductive tract of swine in early pregnancy. *Am. J. Vet. Res.*, 46: 1039-1042.
- Bolin, S.R.; Turek, J.J.; Runnels, L.J.; Gustafsson, D.P. (1983). Pseudorabies virus, porcine parvovirus, and porcine enterovirus interactions with the zona pellucida of the porcine embryo. *Am. J. Vet. Res.*, 44: 1036-1039.
- van Bonte, P.; Vanderplasse, A.; Lagasse, A. (1978). Funtional epididymal in boars. *Zuchthyg.*, 13: 161-175.
- Bøtner, A.; Nielsen, J.; Bille-Hansen, V. (1994). Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a danish swine herd and experimental infection of pregnant

Bibliografía

gilts with the virus. *Vet. Microbiol.*, 40: 351-360.

-Briz, M.; Bonet, S. (1992). A morphological study of the ductus of the epididymis of *Sus domesticus*. *J. Morphology*

-Brouwer, J.; Frankena, K.; de Jong, M.F.; Voerts, R.; Dijkhuizen, A.; Verheijden, J.; Komijn, R.E. (1994). PRRS: effect on herd performance after initial infection and risk analysis. *Vet. Q.*, 16: 95-100.

-Brun, A.; Vaganay, A.; Tardy, M.C.; Noe, T.; Vandeputte, J.; Schirvel, C.; Lacoste, F. (1992). Evaluation of etiological elements in the PRRS in pigs. In: *Proc. 12th IPVS Congress*, La Haya, Holanda. p. 108.

-Buffereau J.P. (1992). Commercial PRRS diagnosis service in France. *PDIC Newslett.*, 1-2 noviembre.

-Cafruny, W.A.; Hovinen, D.E. (1988). The relationship between route of infection and minimum infectious dose: studies with lactate dehydrogenase-elevating virus. *J. Virol. Methods*, 20: 265-268.

-Carlson, J. (1992). Encephalomyocarditis virus (EMCV) as a cause of reproductive and respiratory disease in swine. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 23.

-Carman, S.; Sanford, S.E.; Dea, S. (1995). Assessment of seropositivity to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in swine herds in Ontario-1978 to 1982. *Can. Vet. J.*, 36: 776-777.

-Carvalho, L.F.; Segalés, J.; Pijoan, C. (1995). Effect of PRRSV on subsequent *Pasteurella multocida* challenge in pigs. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhage, Dinamarca. p. 20.

-Clavert, A.; Cranz, C.; Brun, B. (1981). Epididymal vascularization and microvascularization. *Prog. Reprod. Biol.*, 8: 48-57.

-Collins, J.E. (1991). Diagnostic notes; a newly recognized respiratory syndrome in north american swine herds. *Am. Assoc. Swine Pract. News.*, 3: 7-11.

Bibliografia

- Collins, J.E.; Benfield, D.A.; Christianson, W.T.; Harris, L.; Christopher-Hennings, J.; Shaw, D.P.; Goyal, S.M.; McCullough, S.; Morrison, R.B.; Joo, H.S.; Gorcyca, D.; Chladek, D. (1992). Isolation of swine infertility and respiratory syndrome virus (isolate ATCC VR-2332) in North America and experimental reproduction of the disease in gnotobiotic pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4: 117-126.
- Collins, J.E.; Benfield, D.A.; Christianson, W.T.; Harris, L.; Gorcyca, D.E.; Chladek, D.W.; Morrison, R.B. (1991). Swine infertility and respiratory syndrome (mystery swine disease). In: *MN Swine Conf. for Vet.*, St. Paul, USA. pp. 200-205.
- Collins, J.E.; Rossow, K.D. (1993). Pathogenesis of PRRS. In: *Proc. AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp. 47-48.
- Collins, J.E.; Rossow, K.D. (1996). porcine reproductive and respiratory syndrome in the boar and sow. *Proc. Swine Reproduc. Symp.*, pp. 61-70.
- Conzelmann, K.K.; Visser, N.; van Woensel, P.; Thiel, H.J. (1993). Molecular characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, a member of the arterivirus group. *Virology*, 193: 329-339.
- Cooper, V.L.; Doster, A.R.; Hesse, R.A.; Harris, N.B. (1995). Porcine reproductive and respiratory syndrome: NEB-1 PRRSV infection did not potentiate bacterial pathogens. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7: 313-320.
- Cordioli, P.; Sala, G.; Brocchi, E.; Gamba, D.; de Simone, F. (1996). Diagnostic use of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome viurs. In: *Proc. 14th IPVS Congress*. Bolonia, Italia. p. 86.
- Cheon, D.S.; Chae, C.; Lee, Y.S. (1996). Seroprevalence of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) in breeding sows from Republic of Korea. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 79.
- Cho, H.J.; Deregt, D.; Joo, H.S. (1996). An ELISA for porcine reproductive and respiratory syndrome: production of antigen of high quality. *Can. J. Vet. Res.*, 60: 89-93.

Bibliografía

- Cho, S.J.; Freese, W.R.; Yoon, I.J.; Trigo, A.V.; Joo, H.S. (1993). Seroprevalence of indirect fluorescent antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in selected swine herds. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5: 259-260.
- Choi, C.; Christianson, W.; Collins, J.; Joo, H.; Molitor, T. (1992). Antibody-dependent enhancement of SIRS virus replication. *Am Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 30.
- Christianson, W.T.; Collins, J.E.; Benfield, D.A.; Harris, L.; Gorcyca, D.E.; Chladek, D.W.; Morrison, R.B.; Joo, H.S. (1992). Experimental reproduction of swine infertility and respiratory syndrome in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.*, 53: 485-488.
- Christianson, W.T.; Collins, J.E.; Pijoan, C.; Joo, H.S. (1991). Swine infertility and respiratory syndrome. *Pig Vet. J.*, 27: 9-12.
- Christianson, W.T.; Connor, J.C.; Crowe, C.K.; Joo, H.S.; Yoon, I.J. (1994a). Elimination of PRRS virus with isowean. In: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Thailand. p. 68.
- Christianson, W.T.; Choi, C.S.; Collins, J.E.; Molitor, T.W.; Morrison, R.B.; Joo, H.S. (1993). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in mid-gestation sows and fetuses. *Can. J. Vet. Res.*, 57: 262-268.
- Christianson, W.T.; Joo, H.S. (1994b). Porcine reproductive and respiratory syndrome: a review. *Swine Health Prod.*, 2: 10-28.
- Christopher-Hennings, J.; Nelson, E.A.; Benfield, D.A. (1992). Evaluation of the antibody response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PPRS) virus by indirect fluorescent antibody (IFA), virus neutralization (VN) and immunoblotting. In: *73rd Conf. Res. Work. Ani. Dis.*, Chicago, USA. p. 66.
- Christopher-Hennings, J.; Nelson, E.A.; Benfield, D.A. (1996a). Detecting PRRSV in boar semen. *Swine Health Prod.*, 4: 37-39.
- Christopher-Hennings, J.; Nelson, E.A.; Hines, R.J.; Nelson, J.K.; Swenson, S.L.; Zimmerman, J.J.; Chase, C.C.L.; Yaeger, M.J.; Benfield, D.A. (1995a). Persistence of porcine

Bibliografía

reproductive and respiratory syndrome virus in serum and semen of adult boars. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7: 456-464.

-Christopher-Hennings, J.; Nelson, E.A.; Nelson, J.K.; Benfield, D.A. (1996b). Evaluation of the RespPRRS® modified-live PRRSV vaccine in adult boars. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 74.

-Christopher-Hennings, J.; Nelson, E.A.; Nelson, J.; Hines, R.J.; Swenson, S.L.; Hill, H.T.; Zimmerman, J.J.; Katz, J.B.; Yaeger, M.J.; Chase, C.C.L.; Benfield, D.A. (1995b). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar semen by PCR. *J. Clin. Microbiol.*, 33: 1730-1734.

-Christopher-Hennings, J.; Nelson, E.; Nelson, J.; Swenson, S.; Zimmerman, J.; Katz, J.; Yaeger, M.; Chase, C.; Benfield, D. (1995c). Persistent of shedding of PRRSV in boar semen. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhage, Dinamarca. p. 53.

-Dea, S.; Bilodeau, R.; Athanaseous, R.; Sauvageau, R.A.; Martineau, G.P. (1992a). PRRS syndrome in Quebec: isolation of a virus serologically related to Lelystad virus. *Vet. Rec.*, 130: 167.

-Dea, S.; Bilodeau, R.; Athanaseous, R.; Sauvageau, R.A.; Martineau, G.P. (1992b). PRRS in Québec: virologic and pathologic aspects. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 2-7.

-Dea, S.; Bilodeau, R.; Athanaseous, R.; Sauvageau, R.A.; Martineau, G.P. (1992c). Swine reproductive and respiratory syndrome in Québec: isolation of an enveloped virus serologically-related to Lelystad virus. *Can. Vet. J.*, 33: 801-808.

-Dee, S. (1992). Investigation of a nationwide outbreak of SIRS using a telephone survey. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 41-44.

-Dee, S.A. (1993). An effort to eradicate PRRS. *Swine Pract.*, mayo: 18-20.

-Dee, S. (1996a). PRRS: trans-atlantic cooperation and new ideas. *Br. Vet. J.*, 152: 127-129.

-Dee, S. (1996b). The decision on using PRRS vaccine in the breeding herd: when and how to use

Bibliografía

it. In : *Proc. AD. Leman Conf.*, St. Paul, USA. pp. 143-146.

-Dee, S.; Collins, J.; Halbur, P.; Keffaber, K.; Lautner, B.; McCaw, M.; Polson, D.; Rodibaugh, M.; Sanford, E.; Yeske, P. (1996a). Control of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Swine Health Prod.*, 4: 95-98.

-Dee, S.; Joo, H.S. (1994a). Prevention of the spread of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in endemically infected pig herds by nursery depopulation. *Vet. Rec.*, 135: 6-9.

-Dee, S.; Joo, H.S. (1994b). Recurrent reproductive failure associated with porcine reproductive and respiratory syndrome in a swine herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.* , 205: 1017-1018.

-Dee, S.; Joo, H.S. (1996). PRRS serology: a critical component of the diagnostic workup. *Swine Health Prod.*, 4: 100-101.

-Dee, S.; Joo, H.S.; Henry, S.; Tokach, L.; Park, B.K.; Molitor, T.; Pijoan, C. (1996b). Detecting subpopulations after PRRS virus infection in large breeding herds using multiple serologic tests. *Swine Health Prod.*, 4: 181-184.

-Dee, S.; Joo, H.S.; Pijoan, C. (1994). Controlling the spread of PRRS virus in the breeding herd through management of the gilt pool. *Swine Health Prod.*, 3: 64-69.

-Dee, S.; Joo, H.S.; Polson, D.D. (1996c). Improved performance of a large pig complex after sequential nursery depopulation. *Vet. Rec.*, 138: 31-34.

-Dee, S.; Joo, H.S.; Polson, D.D.; Marsh, W.E.; Pijoan, C. (1996d). An evaluation of nursery depopulation as a strategy for controlling post-weaning PRRS: a summary of 34 farms. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 68.

-Dee, S.; Morrison, R.B.; Joo, H.S. (1993). Eradicating porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus using two-site production and nursery depopulation. *Swine Health Prod.*, 1: 20-23.

-van Denmark, N.L.; Free, M.J. (1970). Temperature effects. In: *The testis*. Ed.: AD Johnson, W.R. Gomez, N.L. van Denmark. New York Academic Press, pp. 233-312.

Bibliografía

- Dial, G.D.; Hull, R.D.; Olson, C.L.; Hill, H.T.; Erickson, G.A. (1990). Mystery swine disease: implications and needs of the North American swine industry. In: *MSD Comm. Meet.* Denver, USA. pp. 3-6.
- Dial, G.D.; Parsons, T. (1989). SMEDI-like syndrome (EMC?). In: *Proc. Annu. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, 20: 435.
- Dobrinsky, J.R.; Johnson, L.A. (1994). Cryopreservation of porcine embryos by vitrification: a study of *in vitro* development. *Theriogenology*, 42: 25-35.
- Done, S.H.; Paton, D.J. (1995). Porcine reproductive and respiratory syndrome: clinical disease, pathology and immunosuppression. *Vet. Rec.*, 136: 32-35.
- Done, S.H.; Paton, D.J.; Brown, I.; Cooley, W. (1992). Pathology of porcine reproductive and respiratory syndrome in the UK. In: *Proc. 12th IPVS Congress*, La Haya, Holanda. p. 111.
- Done, S.H.; Paton, D.J.; White, E.C. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS): a review, with emphasis on pathological, virological and diagnostic aspects. *Br. Vet. J.*, 152: 153-174.
- Drew, T.W. (1995). Comparative serology of porcine reproductive and respiratory syndrome in eight european laboratories, using immunoperoxidase monolayer assay and enzyme-linked immunosorbent assay. *Rev. Sci. Tech. Off. Int. Epiz.*, 14: 761-775.
- Drew, T.W.; Meulenberg, J.J.M.; Sands, J.J.; Paton, D.J. (1995). Production, characterization and reactivity of monoclonal antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.*, 76: 1361-1369.
- Dulac, G.C.; Singh, E.L. (1988). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. XII. The *in vitro* exposure of *zona pellucida*-intact embryos to hog cholera virus. *Theriogenology*, 29: 1335-1341.
- Edwards, S.; Robertson, I.B.; Wilemith, J.; Ryan, J.; Kilner, C.; Paton, D.; Drew, T.; Brown, I.; Sands, J. (1992). PRRS (blue-eared pig disease) in Great Britain. *Am. Assoc. Swine Pract.*

Bibliografía

News., 4: 32-36.

-Einarson, S.; Gustafson, B. (1973). A case of epididymal dysfunction in boar. *Andrologie*, 5: 273-279.

-Feitsma, H.; Grooten, H.J.; v. Schie, F.W.; Colenbrander, B. (1992). The effect of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) on sperm production. In: *Proc. 12th Internl. Congress Ani. Reprod.* La Haya, Holanda. pp. 1710-1712.

-Fichtner, D.; Bergmann, S.; Schirrmeier, H. (1994). Einsatz des indirekten immunfluoreszentests zum nachweis von antikörpern gegen das virus des porcine reproductive and respiratory syndrome. *Monatshefte für Veterinarmedizin*, 49: 223-227.

-Fiedler, J. (1991). Report on the epidemiology of PRRS in Germany. In: *European Comm. Seminar on PRRS*, Bruselas, Bélgica. pp. 13-15.

-Fisher, R.A. (1934). Statistical methods for research workers. Ed. Oliver and Boyd, Edinburgo (Reino Unido).

-Freese, W.R.; Joo, H.S. (1994). Cessation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus spread in a commercial swine herd. *Swine Health and Prod.*, 2: 13-15.

-Frey, M.; Eernisse, K.; Landgraf, J.; Pearson, J.; Chladek, D. (1992). Diagnostic testing for SIRS virus at the national veterinary services laboratories (NVSL). *Am.Assoc. Swine Pract. News.*, 4: 31.

-Frey, M.L.; Landgraf, J.G.; Schmitt, B.J.; Eernisse, K.A.; Pearson, J.E. (1995). Recovery of porcine reproductive and respiratory syndrome virus from tissues of slaughter weight pigs. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhage, Dinamarca. p. 28.

-Galina, L.; Pijoan, C.; Sitjar, M.; Christianson, W.T.; Rossow, K.; Collins, J.E. (1994). Interaction between *Streptococcus suis* serotype 2 and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in specific pathogen-free piglets. *Vet. Rec.*, 134: 60-64.

-Godeny, E.K.; Chen, L.; Kumar, S.N.; Methven, S.L.; Koonin, E.V.; Brinton, M.A. (1993).

Bibliografía

Complete genomic sequence and phylogenetic analysis of the lactate dehydrogenase-elevating virus (LDV). *Virology*, 194: 585-596.

-Goovaerts, D.; Visser, N. (1992). Vascular lesions in pigs infected with PRRS. In: *Proc. 12th IPVS Congress*, La Haya, Holanda. p. 129.

-Gorcyca, D.; Schlesinger, K.; Chladek, D.; Behan, W.; Polson, D.; Roof, M.; Doitchenoff, D. (1995a). RespPRRS: a new tool for the prevention and control of PRRS in pigs. In: *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.*, pp. 1-22.

-Gorcyca, D.; Schlesinger, K.; Chladek, D.; Morrison, R.; Wensvoort, G.; Dee, S.; Polson, D. (1997a). A summary of experimental and field studies evaluating the safety and efficacy of RespPRRS/Repro™ for the control of PRRS-induced reproductive disease. In: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canada. pp. 203-214.

-Gorcyca, D.E.; Schlesinger, K.J.; Chladek, D.C.; Roof, M.B.; Polson, D.D.; Daniel, M.; Primo, R. (1997b). Efficacy study of PRRS modified live virus (MLV) vaccine when administered to pregnant sows of gilts in the second trimester of gestation and experimentally challenged in the third trimester. In: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canada. pp. 175-176.

-Gorcyca, D.E.; Schlesinger, K.J.; Geeding, P.W.; Chladek, D.W.; Short, J.A. (1996a). The effect of maternal immunity on respiratory disease syndrome caused by porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 61.

-Gorcyca, D.E.; Schlesinger, K.J.; Geeding, P.W.; Chladek, D.W.; Short, J.A. (1996b). Protection against the reproductive disease caused by porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by vaccinating with a modified live virus PRRS vaccine prior to breeding. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 66.

-Gorcyca, D.; Spiess, D.; Harris, L.; Schlesinger, K.; Chladek, D.; Morrison, R.; Schultz, R. (1993). The effect of a previous porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus challenge in pregnant sows after subsequent exposure to virulent virus. In: *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.*, p. 51.

Bibliografía

- Gorceyca, D.E.; Spronk, G.; Morrison, R.; Polson, D. (1995b). Field evaluation of a new MLV PRRS virus vaccine: applications for PRRS prevention and control in swine herds. In: *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.*, pp. 401-412.
- Gordon, S.C. (1992). Effects of blue-eared pig disease on a breeding and fattening unit. *Vet. Rec.*, 130: 513-514.
- Goyal, H.O. (1985). Morphology of the bovine epididymis. *Am. J. Anat.*, 172: 155-172.
- Goyal, S.M. (1993). Porcine reproductive and respiratory syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5: 656-664.
- Gradil, C.; Dubuc, C.; Eaglesome, M.D. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: seminal transmission. *Vet. Rec.*, 138: 521-522.
- Gradil, C.; Molitor, T.; Harding, M.; Crabo, B. (1990). Excretion of porcine parvovirus through the genital tract of boars. *Am. J. Vet. Res.*, 51: 359-362.
- Grahm, T.C.; Fahning, M.L.; Zemjanis, R. (1984). Nature of early reproductive failure caused by bovine viral diarrhea virus. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 185: 429-432.
- Groschup, M.H.; Brun, A.; Haas, B. (1993). Serological studies on the potential synergism of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and influenza-, corona- and paramyxoviruses in the induction of respiratory symptoms in swine. *J. Vet. Med. B*, 40: 681-689.
- Grosse-Beilage, E.; Grosse Beilage, T. (1993). Epidemiological investigations in the course of the reproductive performance after PRRS (PEARS) in pig breeding herds. *Deutsche Tierärztliche Wochenschrift*, 100: 32-36.
- Halbur, P.G.; Andrews, J.J.; Huffman, E.L.; Paul, P.S.; Meng, X.J.; Niyo, Y. (1994a). Development of a streptavidin-biotin immunoperoxidase procedure for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus antigen in porcine lung. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6: 254-257.

Bibliografía

- Halbur, P.G.; Miller, L.D.; Paul, P.S.; Meng, X.J.; Huffman, E.L.; Andrews, J.J. (1995a). Immunohistochemical identification of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigen in the heart and lymphoid system of three-week-old colostrum-deprived pigs. *Vet. Pathol.*, 32: 200-204.
- Halbur, P.G.; Paul, P.S.; Frey, M.L.; Landgraf, J.; Eernisse, K.; Meng, X.J.; Andrews, J.J.; Lum, M.A.; Rathje, J.A. (1996). Comparison of the antigen distribution of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.*, 33: 159-170.
- Halbur, P.G.; Paul, P.S.; Frey, M.L.; Landgraf, J.; Eernisse, K.; Meng, X.J.; Lum, M.A.; Andrews, J.J.; Rathje, J.A. (1995b). Comparison of the pathogenicity of two US porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates with that of the Lelystad virus. *Vet. Pathol.*, 32: 648-660.
- Halbur, P.; Paul, P.S.; Janke, B.H. (1993). Viral contributors to the porcine respiratory disease complex. In: *Proc. 24th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Kansas City, USA. pp. 343-350.
- Halbur, P.; Paul, P.; Meng, X.; Hagemoser, W. (1994b). Marked variability in pathogenicity of nine US porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in 5-weeks-old CDCD pigs. In: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Thailand. p. 59.
- Harris, L.; Gorcyca, D.; Schlesinger, K.; Schultz, R.; Chladek, D.; Morrison, R.; Keffaber, K. (1992). Case reports of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS). In: *Proc. 23rd Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Nashville, USA. pp. 71-96.
- Hesse, R.A.; Couture, L.P.; Lau, M.L.; Wasmoen, T.L.; doster, A.R.; Cooper, V.L. (1997). Efficacy of Prime Pac PRRS in controlling PRRS respiratory disease: homologous and heterologous challenge. In: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canada. pp. 137-144.
- Hill, H.T. (1990). Overview and history of mystery swine disease (swine infertility/respiratory syndrome). In: *Proc. MSD Comm. Meet.*, Denver, USA. 1: 29-30.

Bibliografía

- Hill, H.T.; Owen, W.J.; Eernisse, K.A.; Zimmerman, J.; Uhlenhopp, E.K.; Frey, M.L. (1992). Prevalence of SIRS virus in Iowa swine herds. *Am. Assoc. Swine PractNewsL.*, 4: 47.
- Hoeftling, D.C. (1990). Mystery swine disease. In: *94th Ann. Meet. United States Ani. Health Assoc.*, pp.501-504.
- Hooper, C.C.; van Alstine, W.G.; Stevenson, G.W.; Kanitz, C.L. (1994). Mice and rats (laboratory and feral) are not a reservoir for PRRS virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6: 13-15.
- Hopper, S.A.; White, M.E.C.; Twiddy, N. (1992). An outbreak of blue-eared pig disease (porcine reproductive and respiratory syndrome) in four pig herds in Great Britain. *Vet. Rec.*, 131: 140-144.
- Houben, S.; Callebaut, P.; Pensaert, M.B. (1995a). Comparative study of a blocking enzyme-linked immunosorbent assay and the immunoperoxidase monolayer assay for the detection of antibodies to the porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pigs. *J. Virol. Meth.*, 51: 125-128.
- Houben, S.; van Reeth, K.; Pensaert, M.B. (1995b). Pattern of infection with the porcine reproductive and respiratory syndrome virus on swine farms in Belgium. *J. Vet. Med. B.* 42: 209-215.
- Hurtgen, J.P. (1984). Reproductive examination of the boar. *J. Soc. Theriogenology*, 13: 25 Abstr.
- Hurtgen, J.P.; Larsen, R.; Crabo, B. (1980) Factors affecting the semen quality in the boar. In: *9th Internl. Congress on Animal Reprod. and A.I.*, Madrid, España. p.271 Abstr.
- Hutchinson, D.; Hesse, R.; Wasmoen, T. (1997). Evaluation of semen quality and virus shedding in boars vaccinated with Prime Pac PRRS and challenged with virulent PRRS virus. In: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 145-148.
- Johnson, L.A.; Truitt-Gibert, A. A.J. (1982). Incidence and ultrastructure of abnormalities in porcine spermatozoa. *Annals of the New York Academy of Sci.*, 383: 466-468.

Bibliografia

- de Jong, M.F.; Cromwijk, W.; van't Veld, P.(1991a). The new pig disease: epidemiology and production losses in the Netherlands. In: *European Comm. Seminar on PRRS*, Bruselas, Bélgica. cap. 4.
- de Jong, M.F.; van't Veld, P.; Cromwijk, W. (1991b). The epidemiology of PRRS in the Netherlands. In: *European Comm. Seminar on PRRS*, Bruselas, Bélgica. cap. 2.
- Joo, H.S. (1988). ECM virus causes poor reproduction. *Internl. Piglett.*, 8: 3-4.
- Joo, H.S.; Christianson, W.T.; Kim, H.S. (1990). Encephalomyocarditis virus as a potential cause for mystery swine disease. In: *Proc. MSD Comm. Meet.*, Denver, USA. pp. 62-66.
- Joo, H.S.; Dee, S. (1993). Recurrent PRRS problems in nursery pigs. In: *Proc. AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp.85-88.
- Joo, H.S.; Park, B. (1996). Dual infection of PRRS virus in newborn and postweaning pigs. In: *Proc. AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp. 94-95.
- Joo, H.S.; Yoon, I.J. (1994). Virologic, serologic and pathogenic differences of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus isolates. In: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Tailandia. p. 57.
- Kahr, R.F.; Johnson, M.E.; Bender, G.M. (1977). Studies on the detection of infectious bovine rhinotracheitis (IBR) virus in bovine semen. *Annu. Proc. Am. Vet. Lab. Diagnost.*, 20: 187-208.
- Kang, Y.B.; Kim, Y.J.; Cho, D.H.; Jang, G.H.; Seok, P.; Shin, J.H. (1996a). Efficacy and safety trials of attenuated porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus vaccine (Ingelvac). In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 65.
- Kang, Y.B.; Shin, J.H.; Kim, Y.J. (1994). PRRS: sero-epidemiology of indirect fluorescent antibodies in selected pig breeding farms in Korea. In: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Tailandia. p. 64.
- Kang, Y.B.; Shin, J.H.; Kim, Y.J.; Kweon, C.H.; Yeom, S.H.; Yoo, B.M. (1996b). Sero-epidemiological surveillance of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in the

Bibliografia

Republic of Korea in 1994-1995. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 80.

-Kapur, V.; Elam, M.R.; Pawlovich, T.M.; Murtaugh, M.P. (1996). Genetic variation in porcine reproductive and respiratory syndrome virus isolates in the midwestern United States. *J. Gen. Virol.*, 77: 1271-1276.

-Katz, J.B.; Shafer, A.L.; Eernisse, K.A.; Landgraf, J.G.; Nelson, E.A. (1995). Antigenic differences between European and American isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) are encoded by the carboxyterminal portion of viral open reading frame 3. *Vet. Microbiol.*, 44: 65-76.

-Kavanagh, N.T. (1992). Comment of SIRS. *Internl. Piglett.*, 12: 20.

-Kawashima, N.; Maruyama, K.; Joo, H.S. (1994). Herd investigation and control management of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) outbreak in a Japanese farm. In: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Tailandia. p. 54.

-Kawashima, K.; Yamada, S.; Kobayashi, H.; Narita, M. (1996). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and *Mycoplasma hyorhinis* antigens in pulmonary lesions of pigs suffering from respiratory distress. *J. Comp. Path.*, 114: 315-323.

-Keffaber, K.K. (1989). Reproductive failure of unknown etiology. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 1: 1-10.

-Keffaber, K.; Stevenson, G.; van Alstine, W.; Kanitz, C.; Harris, L.; Gorcyca, D.; Schlesinger, K.; Schultz, R.; Chladek, D.; Morrison, R. (1992). SIRS virus infection in nursery/grower pigs. *Am Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 38-40.

-Kendrick, J.W.; McEntee, K. (1967). The effect of artificial insemination with semen contaminated with IBR-IPV virus. *Cornell Vet.*, 57:3-11.

-Kerkaert, B.; Pijoan, C.; Dial, G. (1994). Financial impact of chronic PRRS. In: *Proc. AD Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp. 217-218.

-Kim, Y.J.; Kang, Y.B.; Kweon, C.H.; Kang, S.Y.; Shin, J.H.; Molitor, T.W.; Benfield, D.A.

Bibliografía

- (1996). Characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolated in the Republic of Korea. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 53.
- Kim, H.S.; Kwang, J.; Yoon, I.J.; Joo, H.S.; Frey, M.L. (1993). Enhanced replication of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in a homogeneous subpopulation of MA-104 cell line. *Arch. Virol.*, 133: 477-483.
- Komijn, R.E.; van Klink, E.G.M.; van der Sande, W.J.H. (1991). The possible effects of weather conditions on the spread of the new pig disease in the Netherlands. In: *European Comm. Seminar on the New Pig Dis.*, Bruselas, Bélgica. cap. 6.
- Kuwahara, H.; Nunoya, T.; Tajima, M.; Kato, A.; Samejima, T. (1994). An outbreak of porcine reproductive and respiratory syndrome in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 56: 901-909.
- Kwang, J.; Kim, H.S.; Joo, H.S. (1994). Cloning, expression, and sequence analysis of the ORF4 gene of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus MN-1b. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6: 293-296.
- Lager, K.M.; Ackerman, M.R. (1994). Pulmonary lesions in fetuses exposed *in utero* to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6: 480-483.
- Lager, K.M.; Halbur, P.G. (1996). Gross and microscopic lesions in porcine fetuses infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 8: 275-282.
- Lager, K.M.; Mengeling, W.L. (1995). Pathogenesis of *in utero* infection in porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.*, 59: 187-192.
- Lager, K.M.; Mengeling, W.L. (1997). Current status of vaccines and vaccination for porcine reproductive and respiratory syndrome. In: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 443-446.
- Lager, K.M.; Mengeling, W.L.; Brockmeier, S.L. (1994). Consequences of porcine epidemic abortion and respiratory virus (PEARSV) infection in bred gilts at different stages of gestation. In: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Tailandia. p. 55.

Bibliografia

- Lager, K.M.; Mengeling, W.L.; Brockmeier, S.L. (1995). Limited cross-protection between two strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant swine. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 10.
- Lager, K.M.; Mengeling, W.L.; Brockmeier, S.L. (1996a). Pathogenesis of fetal porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection during early and late gestation. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 55.
- Lager, K.M.; Mengeling, W.L.; Brockmeier, S.L. (1996b). Effect of post-coital intrauterine inoculation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus on conception in gilts. *Vet. Rec.*, 138: 227-228.
- Larochelle, R.; Magar, R. (1995). Comparison of immunogold silver staining (IGSS) with two immunoperoxidase staining systems for the detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) antigens in formalin-fixed tissues. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7: 540-543.
- Larochelle, R.; Magar, R. (1996). Detection of PRRS virus in paraffin-embedded tissues: comparison of immunohistochemistry and *in situ* hybridization. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 78.
- Larochelle, R.; Mardassi, H.; Dea, S.; Magar, R. (1996). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in cell cultures and formalin-fixed tissues by *in situ* hybridization using a digoxigenin-labeled probe. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 8: 3-10.
- Larochelle, R.; Sauvageau, R.; Magar, R. (1994). Immunohistochemical detection of swine influenza virus and porcine reproductive and respiratory syndrome virus in porcine proliferative and necrotizing pneumonia cases from Québec. *Can. Vet. J.*, 35: 513-515.
- Lindhaus, W.; Lindhaus, B. (1991). Ratselhafte sweeneykrankheit. *Der Praktische Tierarzt.*, 5: 423-425.
- Loemba, H.D.; Mounir, S.; Mardassi, H.; Archambault, D.; Dea, S. (1996). Kinetics of humoral immune response to the major structural proteins of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.*, 141: 751-761.

Bibliografía

- López, A.; Yason, C.; Burton, S. (1994). Serologic evidence of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Can. Vet. J.*, 35: 53.
- Loula, T.J. (1991). Mystery pig disease. *Agri-practice*, 12: 23-34.
- Loula, T.J. (1992). United States seedstock industry results. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 45-46.
- Loula, T.J. (1995). Weaning early for higher health. *Pig Internl.*, 6: 31-32.
- Loula, T.J. (1996). My views on PRRS vaccine use. In: *Proc. AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp. 150-152.
- Magar, R.; Larochelle, R.; Carman, S.; Thomson, S. (1994). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus identification in proliferative and necrotizing pneumonia cases from Ontario. *Can. Vet. J.*, 35: 523-524.
- Magar, R.; Larochelle, R.; Dea, S.; Gagnon, C.A.; Nelson, E.A.; Christopher-Hennings, J.; Benfield, D.A. (1995a). Antigenic comparison of canadian and US isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using monoclonal antibodies to the nucleocapsid protein. *Can. J. Vet. Res.*, 59: 232-234.
- Magar, R.; Larochelle, R.; Robinson, Y.; Dubuc, C. (1993). Immunohistochemical detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus using colloidal gold. *Can. J. Vet. Res.*, 57: 300-304.
- Magar, R.; Robinson, Y.; Dubuc, C.; Larochelle, R. (1995b). Evaluation of the persistence of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pig carcasses. *Vet. Rec.*, 137: 559-561.
- Mardassi, H.; Athanassious, R.; Mounir, S.; Dea, S. (1994a). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: morphological, biochemical and serological characteristics of Québec isolates associated with acute and chronic outbreaks of porcine reproductive and respiratory syndrome. *Can. J. Vet. Res.*, 58: 55-64.
- Mardassi, H.; Massie, B.; Dea, S. (1996). Intracellular synthesis, processing, and transport of

Bibliografía

proteins encoded by ORFs 5 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Virology*, 221: 98-112.

-Mardassi, H.; Mounir, S.; Dea, S. (1994b). Identification of major differences in the nucleocapsid protein genes of a Québec strain and european strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.*, 75: 681-685.

-Mardassi, H.; Mounir, S.; Dea, S. (1995). Molecular analysis of the ORFs 3 to 7 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus, Québec reference strain. *Arch. Virol.*, 140: 1405-1418.

-Mardassi, H.; Wilson, L.; Mounir, S.; Dea, S. (1994c). Detection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus and efficient differentiation between canadian and european strains by reverse transcription and PCR amplification. *J. Clin. Microbiol.*, 32: 2197-2203.

-Martineau, G.P.; Bilodeau, R.; Sauvageau, R.; Dea, S. (1992). Le syndrome reproducteur et respiratoire porcin (SRRP) au Québec: données cliniques, pathologiques et virologiques. *Journées Rech. Porcine en France*, 24: 127-136.

-McCaw, M.B. (1995). MCREBEL PRRS: management procedures for PRRS control in large herd nurseries. In: *Proc. AD Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp. 161-162.

-McCaw, M.; Henry, S. (1995). Elimination of PRRS associated disease losses from a 4000+ sow herd without vaccination or depopulation. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 33.

-McCaw, M.B.; Holtecamp, A.; Roberts, J.; Davies, P. (1996). MCREBEL management system (strictly limited cross-fostering) for controlling PRRS-associated disease losses in suckling and nursery pigs. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 67.

-Medveczky, I.; Szabo, I. (1981). Isolation of Aujeszky's disease virus from boar semen. *Acta Vet. Acad. Sci. Hungary*, 29: 29-35.

-Meldrum, K.C. (1991). New pig disease. *Vet. Rec.*, 128: 483.

Bibliografia

- Meng, X.J.; Paul, P.S.; Halbur, P.G. (1994). Molecular cloning and nucleotide sequencing of the 3'-terminal genomic RNA of the porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.*, 75: 1795-1801.
- Meng, X.J.; Paul, P.S.; Halbur, P.G.; Lum, M.A. (1995). Phylogenetic analyses of the putative M (ORF 6) and N (ORF 7) genes of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): implication for the existence of two genotypes of PRRSV in the U.S.A. and Europe. *Arch. Virol.*, 140: 745-755.
- Meng, X.J.; Paul, P.S.; Morozov, I.; Halbur, P.G. (1996). A nested set of six or seven subgenomic mRNAs is formed in cells infected with different isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Gen. Virol.*, 77: 1265-1270.
- Mengeling, W.L.; Lager, K.M.; Vorwald, A.C. (1994). Temporal characterization of transplacental infection of porcine fetuses with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Am. J. Vet. Res.*, 55: 1391-1398.
- Mengeling, W.L.; Lager, K.M.; Vorwald, A.C. (1995). Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7: 3-16.
- Mengeling, W.L.; Lager, K.M.; Vorwald, A.C. (1996a). An overview on vaccination for porcine reproductive and respiratory syndrome. In : *Proc. AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp. 139-142.
- Mengeling, W.L.; Lager, K.M.; Vorwald, A.C.; Brockmeier, S.L. (1996b). Attenuation of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by serial passage in cell culture. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 64.
- Mengeling, W.L.; Paul, P.S.; Lager, K.M. (1993). Virus-induced maternal reproductive failure of swine. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 203: 1268-1272.
- Mengeling, W.L.; Vorwald, A.C.; Lager, K.M.; Brockmeier, S.L. (1996c). Diagnosis of porcine reproductive and respiratory syndrome using infected alveolar macrophages collected from live pigs. *Vet. Microbiol.*, 49: 105-115.

Bibliografía

- Mengeling, W.L.; Vorwald, A.C.; Lager, K.M.; Brockmeier, S.L. (1996d). Comparison among strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus for their ability to cause reproductive failure. *Am. J. Vet. Res.*, 57: 834-839.

- Meredith, M.J. (1991). "Blue ear" disease epidemic. *Pig News Inform.*, 12: 363.

- Meredith, M.J. (1995). Porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Pig disease information centre, University of Cambridge, Cambridge, UK.*

- Meulenbergh, J.; Bende, R.; Bos, J.; den Besten, A.P.; de Kluyver, E.; Wensvoort, G.; Moormann, R. (1995a). Molecular characterization of Lelystad virus. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 3.

- Meulenbergh, J.J.M.; den Besten, A.P.; de Kluyver, E.P.; Moormann, R.J.M.; Schaaper, W.M.M.; Wensvoort, G. (1995b). Characterization of proteins encoded by ORFs 2 to 7 of Lelystad virus. *Virology*, 206: 155-163.

- Meulenbergh, J.J.M.; Hults, M.M.; de Meijer, E.J.; Moonen, P.L.J.M.; den Besten, A.; de Kluyver, E.P.; Wensvoort, G.; Moormann, R.J.M. (1993a). Lelystad virus, the causative agent of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS), is related to LDV and EAV. *Virology*, 192: 62-72.

- Meulenbergh, J.J.M.; Hults, M.M.; de Meijer, E.J.; Moonen, P.L.J.M.; den Besten, A.; de Kluyver, E.P.; Wensvoort, G.; Moormann, R.J.M. (1994). Lelystad virus belongs to a new virus family, comprising lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus. *Arch. Virol.*, 9: 441-448.

- Meulenbergh, J.J.M.; de Meijer, E.J.; Moormann, R.J.M. (1993b). Subgenomic RNAs of Lelystad virus contain a conserved leader-body junction sequence. *J. Gen. Virol.*, 74: 1697-1701.

- Molitor, T.W. (1993). Immune response to PRRS virus. In: *AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA . pp. 49-50.

- Molitor, T.; Leitner, G.; Choi, C.; Risdahl, J.; Rossow, K.; Collins, J. (1992). Modulation of host immune responses by SIRS virus. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 27-28.

Bibliografía

- Molitor, T.; Shin, J. (1995). Porcine reproductive and respiratory syndrome in boars. In: *Proc. AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp. 101-102.
- Moore, C.; Bilodeau, R.; Wiseman, B. (1990). Clinical aspects and consequences of mystery swine disease in nursery and grow-finish. In: *MSD Comm. Meet.*, Denver, USA. pp. 41-49.
- Morin, M.; Robinson, Y. (1991). Porcine reproductive and respiratory syndrome in Québec. *Vet. Rec.*, 129: 367-368.
- Morozov, I.; Meng, X.J.; Paul, P.S. (1995). Sequence analysis of open reading frames (ORFs) 2 to 4 of a US isolate of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Arch. Virol.*, 140: 1313-1319.
- Morrison, R.B.; Bautista, E.M.; Goyal, S.M.; Collins, J.E.; Anelli, J. (1992a). Seroprevalence of SIRS virus in the United States in 1990. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 47.
- Morrison, R.B.; Bautista, E.M.; Goyal, S.M.; Collins, J.E.; Anelli, J. (1992b). Seroepidemiological investigation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PEARS, PRRS, SIRS). In: *Proc. 12th IPVS Congress*, La Haya, Holanda. p. 114.
- Morrison, R.B.; Collins, J.E.; Harris, L.; Christianson, W.T.; Benfield, D.A.; Chladek, D.W.; Gorcyca, D.E.; Joo, H.S. (1992c). Serologic evidence incriminating a recently isolated virus (ATCC VR-2332) as the cause of swine infertility and respiratory syndrome (SIRS). *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4: 186-188.
- Morrison, R.B.; Gorcyca, D.E.; Spiess, D.E.; Molitor, T.W.; Murtaugh, M.; Schlesinger, K.J.; Chladek, D.W.; Harris, L.L. (1996). Influence of maternal immunity on infection with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 60.
- Mortensen, S.; Madsen, K. (1992). The occurrence of PRRS in Denmark. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 48.
- Mousing, J.; Kooij, D.; Mortensen, S.; McInerney, J. (1996). Economic analysis of control

Bibliografía

strategies for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) in Denmark. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 70.

-Mousing, J.; Permin, A.; Mortensen, S.; Bøtner, A.; Willeberg, P. (1995). A case-control survey of herd-level risk factors for PRRS seropositivity in danish pig herds. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 27.

-Muirhead, M.R. (1992). Mystery Disease, blue ear-control program cuts losses dramatically. *Internl. Piglett.*, 12: 9-11.

-Murakami, Y.; Kato, A.; Tsuda, T.; Morozumi, T.; Miura, Y.; Sugimura, T. (1994). Isolation and serological characterization of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) viruses from pigs with reproductive and respiratory disorders in Japan. *J. Vet. Med. Sci.*, 56: 891-894.

-Murtaugh, M.P.; Elam, M.R.; Kakach, L.T. (1995a). Comparison of the structural protein coding sequences of the VR-2332 and Lelystad virus strains of the PRRS virus. *Arch. Virol.*, 140: 1451-1460.

-Murtaugh, M.P.; Elam, M.R.; Kapur, V.; Pawlovich, T.M. (1995b). Molecular genetic variation in PRRS virus isolates recovered from the midwestern United States of America. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 8.

-Nelson, E.A.; Christopher-Hennings, J.; Benfield, D.A. (1994). Serum immune responses to the proteins of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6: 410-415.

-Nelson, E.A.; Christopher-Hennings, J.; Drew, T.; Wensvoort, G.; Collins, J.E.; Benfield, D.A. (1993). Differentiation of US and european isolates of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by monoclonal antibodies. *J. Clin. Microbiol.*, 31: 3184-3189.

-Nelson, E.A.; Christopher-Hennings, J.; Harris, L.L.; Collins, J.E.; Chladek, D.W.; Gorcyca, D.E.; Benfield, D.A. (1992). Preliminary characterization of monoclonal antibodies to a United States isolate (ATCC VR-2332) of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome virus. In: *Proc. 12th IPVS Congress*, La Haya, Holanda. pp. 121-122.

Bibliografía

- Nelson, E.A.; Nelson, J.K.; Christopher-Hennings, J.; Yoon, K.J.; Magar, R.; Benfield, D.A. (1996). Reactivity of north american PRRSV isolates with a monoclonal panel. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 88.
- Nicolas, Y. (1993). Toujours actif en France, aux USA et au Canada, le SDRP mobilise les équipes de recherche. *La Semaine Vétérinaire*, 694: 18.
- Nielsen, T.L.; Have, P.; Hoff-Jørgensen, R.; Heisel, C.; Bækbo, P.; Bøtner, A. (1995). Examination of PRRS-virus-shedding in semen from vaccinated and non-vaccinated boars. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhage, Dinamarca. p. 26.
- van Nieuwstadt, A.; Meulenbergh, J.; van Essen-Zandbergen, A.; den Besten, A.P.; Bende, R.; Moormann, R.; Wensvoort, G. (1995). Monoclonal antibodies specific for Lelystad virus recognize two additional structural viral proteins, encoded by ORF-3 and ORF-4 of the viral genoma. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhage, Dinamarca. p. 5.
- Nodelijk, G.; van Leengoed, L.A.M.G.; Schoevers, E.J.; Wensvoort, G.; Verheijden, J.H.M. (1996a). Seroprevalence of porcine respiratory and reproductive syndrome virus in dutch weaning pigs. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 72.
- Nodelijk, G.; Wensvoort, G.; Kroese, B.; van Leengoed, L.; Colijn, E.; Verheijden, J. (1996b). Comparison of a commercial ELISA and an immunoperoxidase monolayer assay to detect antibodies directed against porcine respiratory and reproductive syndrome virus. *Vet. Microbiol.*, 49: 285-295.
- Ohlinger, V.F. (1992a). PRRS antibodies were present in E. Germany in 1988/9. *PDIC Newslett.*, 1 dicembre.
- Ohlinger, V.F. (1992b). The porcine reproductive and respiratory syndrome and its significance for artificial insemination (AI) in pigs. In: *4th Meet. of the AI Vets in the EEC*, 1.2 pp. 1-4.
- Ohlinger, V.F. (1995). The respiratory syndrome: studies on PRRSV-replikation and immune response. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhage, Dinamarca. p. 12.

Bibliografia

- Ohlinger, V.F.; Ahl, R.; Haas, B.; Mettenleiter, T.C.; Rziha, H.J.; Straub, O.C.; Weiland, F. (1991a). PRRS-laboratory studies at Tübingen and other German laboratories. In: *European Comm. Seminar on PRRS*, Bruselas, Bélgica. cap. 38.
- Ohlinger, V.F.; Haas, B.; Sallmüller, A.; Beyer, J.; Teuffert, J.; Visser, N.; Weiland, F. (1992a). *In vivo* and *in vitro* studies on the immunobiology of PRRS. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 24.
- Ohlinger, V.F.; Weiland, F.; Haas, B.; Visser, N.; Ahl, R.; Mettenleiter, T.C.; Weiland, E.; Rziha, H.J.; Saalmüller, A.; Straub, O.C. (1991b). Seuchenhafte Spätabort beim Schwein. Ein Beitrag zur Ätiologie des porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). *Tierärztl. Umschau*, 46: 703-708.
- Ohlinger, V.F.; Weiland, F.; Weiland, E.; Mettenleiter, T.; Haas, B.; Vissner, N.; Ahl, R. (1992b). Some aspects of the virus causing PRRS in Germany. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 24.
- Owen, W.J.; Uhlenhopp, E.K.; Hill, H.T.; Frey, M.L.; Eernisse, K.A.; Zimmerman, J. (1992). Preliminary analysis of the Iowa NAHMS swine serum bank. In: *SIRS Comm. Meet.*, Peoria, USA. pp. 243-244.
- Park, B.K.; Collins, J.E.; Joo, H.S. (1996a). Pathogenic effects of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) isolates in swine tracheal ring culture. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 54.
- Park, B.K.; Joo, H.S. (1996). Failure to protect from porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in the piglets from sows exposed during late-term gestation. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 62.
- Park, B.K.; Joo, H.S.; Dee, S.A.; Pijoan, C. (1995). Evaluation of an indirect fluorescent IgM antibody test for the detection of pigs with recent infection of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7: 544-546.
- Park, N.Y.; Kim, S.J.; Chi, Y.T.; Park, C.S. (1996b). Diagnosis of porcine reproductive and

Bibliografía

respiratory syndrome by *in situ* hybridization with non-radioactive probes. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bologna, Italia. p. 81.

-Park, B.K.; Yoon, I.J.; Joo, H.S. (1996c). Pathogenesis of plaque variants of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in pregnant sows. *Am. J. Vet. Res.*, 57: 320-323.

-Paton, D.J. (1995). Porcine reproductive and respiratory syndrome (Blue-eared pig disease). *Rev. Med. Microbiol.*, 6: 119-125.

-Paton, D.J.; Brown, I.H.; Done, S. (1991). Laboratory investigations of "blue eared pig disease" in Great Britain. In: *European Comm. Seminar on PRRS*, Bruselas, Bélgica. cap. 9.

-Paton, D.J.; Brown, I.H.; Scott, A.C.; Done, S.H.; Edwards, S. (1992). Isolation of a Lelystad virus-like agent from british pigs and scanning electron microscopy of infected macrophages. *Vet. Microbiol.*, 33: 195-201.

-Paton, D.J.; Done, S.H. (1992). Porcine reproductive and respiratory syndrome (Blue eared pig disease). *Vet. Ann.*, 32: 278-292.

-Paton, D.J.; Drew, T.W. (1995). Serological monitoring of PRRS transmission: a case study. *Vet. Rec.*, 136: 297-298.

-Paul, P.S.; Halbur, P.G.; Meng, X.; Andrews, J.J. (1992). Proliferative interstitial pneumonia in nursery pigs. In: *SIRS Comm. Meet.*, Peoria, USA. pp. 250-252.

-Phillips, R.M.; Foley, C.W.; Lukert, P.D. (1972). Isolation and characterization of viruses from semen and the reproductive tract of male swine. *J.Am.Vet. Med. Assoc.*, 161:1306-1316.

-Pijoan, C.; Solano, G.; Segalés, J. (1994). PRRS virus and secondary disease. In: *Proc. AD. Leman Swine Conf.*, St. Paul, USA. pp. 225-226.

-Pirtle, E.C.; Beran, G.W. (1996). Stability of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in the presence of fomites commonly found on farms. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 208: 390-392.

Bibliografia

- Plagemann, P.G.W.; Moennig, V. (1992). Lactate dehydrogenase-elevating virus, equine arteritis virus, and simian hemorrhagic fever virus; a new group of positive-strand RNA viruses. *Adv. Virus Res.*, 41: 99-192.
- Plana Durán, J. (1994). Immunoprophylaxis against the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. In: *PRRS Summit*, Raleigh, USA. pp.1-16.
- Plana Durán, J.; Bastons, M.; Urniza, A.; Vayreda, M. (1995a). Vaccine against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 37.
- Plana Durán, J.; Climent, I.; Urniza, A.; Casal, I. (1995b). Recombinant baculovirus vaccines against porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS). In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 49.
- Plana, J.; Vayreda, M.; Vilarrasa, J.; Bastons, M.; Porquet, L.; Urniza, A. (1992a). PEARS (mystery swine disease) - summary of the work conducted by our group. *Am Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 16-18.
- Plana, J.; Vayreda, M.; Vilarrasa, J.; Bastons, M.; Rosell, R.; Martínez, M.; San Gabriel, A.; Pujols, J.; Badiola, J.L.; Ramos, J.A.; Domingo, M. (1992b). Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease). Isolation in Spain of the causative agent and experimental reproduction of the disease. *Vet. Microbiol.*, 33: 203-211.
- Pol, J.M.A.; van Dijk, J.E.; Wensvoort, G.; Terpstra, C. (1991). Pathological, ultrastructural, and immunohistochemical changes caused by Lelystad virus in experimentally induced infections of mystery swine disease (synonym: porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS)). *Vet. Q.*, 13: 137-143.
- Pol, J.; van Leengoed, L.; Stockhofe, N.; Wensvoort, G. (1995). Dual Infections of PRRS/Influenza or PRRS/APP in the respiratory tract. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 22.
- Pol, J.; Wagenaar, F. (1995). Comparative morphogenesis of three PRRS virus strains. In: *2nd*

Bibliografía

Internl. Symp. on PRRS, Copenhagen, Dinamarca. p. 4.

-Pol, J.; Wagenaar, F.; Broekhuijsen-Davies, J.; Wensvoort, G. (1992). The morphogenesis of Lelystad virus in porcine lung alveolar macrophages. In: *Proc. 12th IPVS Congress*, La Haya, Holanda. p. 127.

-Polson, D.D. (1996). Effective PRRS control: what the americans are doing wrong and right. In: *The Pig J. Proc.*, pp. 110-129.

-Polson, D.D.; Marsh, W.E.; Dial, G.D. (1990). Financial implications of mystery swine disease (MSD). In: *MSD Comm. Meet.*, Denver, USA. pp. 8-28.

-le Potier, M.F.; Blanquefort, P.; Morvan, E.; Albina, E. (1995). Results of a control program for PRRS in the french area "Pays de Loire". In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 34.

-Potter, R.A. (1994). Non-transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by seropositive pigs from an infected herd. *Vet. Rec.*, 134: 304-305.

-Pozzi, P.G. (1996). Serological monitoring towards PRRS virus on sows in farms in northern Italy. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 85.

-Pretzer, S.D.; Claussen, K.M.; Bergstrom, J.R.; Henry, S.C.; Phillips, R.; Tokach, M.D.; Goodband, R.D.; Nelssen, J.L.; Dritz, S.S. (1997). The effects of vaccination for porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) on postweaning growth performance. In: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 265-269

-Pursel, V.G.; Johnson, L.A. (1974). Reproductive examination of the boar. *J. Soc. Theriogenology*, 13: 25 abstr.

-Ramos, J.A.; Pujols, J.; Domingo, M.; Miller, M.A.; Rosell, R.; Badiola, I.; Pérez de Rozas, Á.; Majo, N.; San Gabriel, A. (1992). Experimental infection of weaner pigs with PRRS. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 25.

Bibliografía

- Raymarkers, J.M.L. (1991). The experience of the veterinary practice in Someren (Netherlands) with PEARs. In: *European Comm. Seminar on PRRS.*, Bruselas, Bélgica. p. 16.
- Reed, J.J.; Muench, R.H. (1938). A simple method to estimating fifty percent end points. *Am. J. Hyg.*, 27: 493-497.
- van Reeth, K.; van Hoof, D.; Willens, L.; Pensaert, M. (1996a). A clinical study of dual infections with porcine reproductive-respiratory syndrome virus and swine influenza virus administered with different time intervals. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 59.
- van Reeth, K.; Nauwynck, H.; Pensaert, M. (1996b). Dual infection of feeder pigs with porcine reproductive and respiratory syndrome virus followed by porcine respiratory coronavirus or swine influenza virus: a clinical and virological study. *Vet. Microbiol.*, 48: 325-335.
- Robert, F.; Mathonnet, J.A.; Auvigne, V.; Riaucourt, A.; Laval, A. (1993). Le syndrome dysgénésique et respiratoire porcin: répercussions cliniques, sérologiques et techniques en Bretagne. In: *Journées Rech. Porcine en France*, 25: 355-360.
- Robertson, I.B. (1992a). Porcine reproductive and respiratory syndrome (blue-eared pig disease): some aspects of its epidemiology. In: *Proc. Society Vet. Epidemiol. Preventive Med.*, Edimburgo, UK. pp. 24-38.
- Robertson, I.B. (1992b). Transmission of blue-eared pig disease. *Vet. Rec.*, 130: 478-479.
- Roof, M.B.; Gingerich-Feil, D.; Gorcyca, D.; Schlesinger, K.; Chladek, D. (1995). Serological evaluation of pigs vaccinated with RespPRRS® using the IDEXX PRRS ELISA. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 50.
- Rossow, E.D.; Bautista, E.M.; Goyal, S.M.; Molitor, T.W.; Murtaugh, M.P.; Morrison, R.B.; Benfield, D.A.; Collins, J.E. (1994a). Experimental porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in one-, four-, and 10-week-old pigs. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6: 3-12.
- Rossow, E.D.; Bautista, E.M.; Goyal, S.M.; Murtaugh, M.P.; Molitor, T.W.; Morrison, R.B.; Benfield, D.A.; Collins, J.E. (1992). The effect of pig age on clinical disease and immunopathogenesis of SIRS virus infection. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 26.

Bibliografía

- Rossow, K.D.; Benfield, D.A.; Goyal, S.M.; Nelson, E.A.; Christopher-Hennings, J.; Collins, J.E. (1996a). Chronological immunohistochemical detection and localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.*, 33: 551-556.
- Rossow, K.D.; Collins, J.E.; Goyal, S.M.; Nelson, E.A.; Christopher-Hennings, J.; Benfield, D.A. (1995). Pathogenesis of porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection in gnotobiotic pigs. *Vet. Pathol.*, 32: 361-373.
- Rossow, K.D.; Laube, K.L.; Goyal, S.M.; Collins, J.E. (1996b). Fetal microscopic lesions in porcine reproductive and respiratory syndrome virus-induced abortion. *Vet. Pathol.*, 33: 95-99.
- Rossow, K.D.; Morrison, R.B.; Goyal, S.M.; Singh, G.S.; Collins, J.E. (1994b). Lymph node lesions in neonatal pigs congenitally exposed to porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6: 368-371.
- Sanford, E.S. (1992). Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS): establishment and spread between 1987 and 1992 in Ontario, Canada. In: *Proc. 12th IPVS Congress*, La Haya, Holanda. p. 117.
- Sanford, S.E.; Moore, C. (1995). The impact of PRRS on the Canadian swine industry. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 25.
- Sanford, S.E.; Nuhn, B. (1996). Reduced morbidity and mortality and improved days-to-market in piglets vaccinated with Ingelvac RespPRRS® in a PRRS endemic herd. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 77.
- Sanz, A.; Miguet, J.G.; Cortés, E.; Sarraseca, J.; Climent, I.; Plana-Durán, J.; Casal, I. (1995). Development of diagnostic assays for antibodies to porcine reproductive and respiratory syndrome virus using monoclonal antibodies and a recombinant antigen. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 17.
- Schilling, E.; Vengust, M.; Smidt, D. (1984). ORT.- A new test to predict the freezability and storage of boar spermatozoa. In: *Proc. 8th IPVS Congress*, Bélgica. p.296 Abstr.

Bibliografía

- Schukken, Y.H.; de Jong, J.C.M.; Komijn, R.E.; Braamskamp, J.; Dijkhuizen, A.A.; Noordhuizen, J.P.T.M.; Vernooy, J.C.M.; Verheijden, J.H.M. (1992). Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome PEARS-positive and PEARS-negative diagnoses for breeding and multiplier herds in the Netherlands using statistical methods. *Tijdschrift voor Diergeneeskunde*, 117: 259-264.
- Shimizu, M.; Yamada, S.; Kawashima, K.; Ohashi, S.; Shimizu, S.; Ogawa, T. (1996). Changes of lymphocyte subpopulations in pigs infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Vet. Immunol. Immunopathol.*, 50: 19-27.
- Shimizu, M.; Yamada, S.; Murakami, Y.; Morozumi, T.; Kobayashi, H.; Mitani, K.; Ito, N.; Kubo, M.; Kimura, K.; Kobayashi, M.; Yamamoto, K.; Miura, Y.; Yamamoto, T.; Watanabe, K. (1994). Isolation of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus from Heko-Heko disease of pigs. *J. Vet. Med. Sci.*, 56: 389-391.
- Shin, J.H.; Kim, Y.J.; Kang, Y.B.; Joo, H.S. (1994). On-farm elimination of PEARS in a farrow-to-finish herd. In: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Thailand. p. 67.
- Shin, J.H.; Torrison, J.; Choi, C.S.; González, S.M.; Grabo, B.G.; Molitor, T.W. (1995). Monitoring of PRRS virus infection in boars. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 55.
- Shin, J.; Torrison, J.; Kang, Y.B.; Molitor, T.W. (1996a). *In situ* localization of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in boar tissues. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 57.
- Shin, J.H.; Torrison, J.; McMullen, K.; Woods, R.; Molitor, T.W. (1996b). Monitoring of virus nucleic acids in boar semen. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 82.
- Singh, E.L.; McVicar, J.W.; Hare, W.C.D.; Mebus, C.A. (1984). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. VII. The *in vitro* exposure of bovine and porcine embryos to foot-and-mouth disease virus. *Theriogenology*, 26: 587-593.

Bibliografía

- Singh, E.L.; Thomas, F.C. (1987). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. IX. The *in vitro* exposure of zona pellucida-intact porcine embryos to swine vesicular disease virus. *Theriogenology*, 27: 443-449.
- Singh, E.L.; Thomas, F.C. (1987). Embryo transfer as a means of controlling the transmission of viral infections. XI. The *in vitro* exposure of bovine and porcine embryos to vesicular stomatitis virus. *Theriogenology*, 28: 691-697.
- Stevenson, G.W.; van Alstine, W.G.; Kanitz, C.L. (1994). Characterization of infection with endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus in a swine herd. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 204: 1938-1942.
- Stevenson, G.W.; van Alstine, W.G.; Kanitz, C.L.; Keffaber, K.K. (1992). Endemic SIRS virus isolation in nursery pigs originating from older viremic dams. In: *Am. Assoc. Vet. Lab. Diagn.*, Louisville, USA. p. 72.
- Stevenson, G.W.; van Alstine, W.G.; Kanitz, C.L.; Keffaber, K.K. (1993). Endemic porcine reproductive and respiratory syndrome virus infection of nursery pigs in two swine herds without current reproductive failure. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 5: 432-434.
- Stockhofe-Zuwieden, N.; Navarro Camarro, J.A.; Grosse-Beilage, E.; Chavez, J.; Pohlenz, J. (1993). Uterine and placental alterations in pregnant sows associated with the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS). *J. Vet. Med. B*, 40: 261-271.
- Suárez, P.; Díaz-Guerra, M.; Prieto, C.; Esteban, M.; Castro, J.M.; Nieto, A.; Ortín, J. (1996a). Open reading frame 5 of porcine reproductive and respiratory syndrome virus as a cause of virus-induced apoptosis. *J. Virol.*, 70: 2876-2882.
- Suárez, P.; Zardoya, R.; Martín, M.J.; Prieto, C.; Dopazo, J.; Solana, A.; Castro, J.M. (1996b). Phylogenetic relationships of european strains of porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) inferred from DNA sequences of putative ORF-5 and ORF-7 genes. *Virus Res.*, 42: 159-165.
- Suárez, P.; Zardoya, R.; Prieto, C.; Solana, A.; Tabarés, E.; Bautista, J.M.; Castro, J.M. (1994). Direct detection of the porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus by

Bibliografía

reverse polymerase chain reaction (RT-PCR). *Arch. Virol.*, 135: 89-99.

-Swenson. S.L.; Hill, H.T.; Zimmerman, J.J.; Evans, L.E.; Bechtol, D.; Hopkins, S.; Wills, R.; Yoon, K.J.; Schwartz, K.J.; Hill, H.; McGinley, M.J. (1995a). Exposure of gilts to PRRS virus by artificial insemination. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhage, Dinamarca. p. 42.

-Swenson. S.L.; Hill, H.T.; Zimmerman, J.J.; Evans, L.E.; Landgraf, J.G.; Wills, R.W.; Sandersen, T.P.; McGinley, M.J.; Brevik, A.K.; Ciszewski, D.K.; Frey, M.L. (1994a). Excretion of porcine reproductive and respiratory syndrome virus in semen after experimentally induced infection in boars. *J. Am. Vet. Med. Assoc.*, 204: 1943-1948.

-Swenson. S.L.; Hill, H.T.; Zimmerman, J.J.; Evans, L.E.; Landgraf, J.G.; Wills, R.W.; Yoon, K.J.; Schwartz, K.J.; Althouse, G.C.; McGinley, M.J.; Brevik, A.K. (1994b). Artificial insemination of gilts with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus-contaminated semen. *Swine Health Prod.*, 2: 19-23.

-Swenson. S.L.; Hill, H.T.; Zimmerman, J.J.; Evans, L.E.; Wills, R.W.; Yoon, K.J.; Schwartz, K.J.; Althouse, G.C.; McGinley, M.J.; Brevik, A.K. (1995b). Preliminary assessment of an inactivated PRRS virus vaccine on the excretion of virus in semen. *Swine Health Prod.*, 3: 244-247.

-Swiestra, E.E. (1968). Cytology and duration of the cycle of seminiferous epithelium of the boar: duration of spermatozoa transit through the epididymus. *Anat. Rec.*, 161: 171-186.

-Thacker, C. (1992). Serological surveys in a herd before, during and after an outbreak of SIRS. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 40.

-Thacker, B.J.; Joo, H.S.; Winkelman, N.L.; Leman, A.D.; Barnes, D.M. (1987). Clinical, virologic, and histopathologic observations of induced porcine parvovirus infection in boars. *Am. J. Vet. Res.*, 48: 763-767.

-Terpstra, C.; Wensvoort, G.; Leengoed, L.A.M.G. (1992). Persistence of Lelystad virus in herds affected by porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. In: *Proc. 12th IPVS Congress*, La haya, Holanda. p. 118.

Bibliografía

- Terpstra, C.; Wensvoort, G.; Pol, J.M.A. (1991). Experimental reproduction of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (mystery swine disease) by infection with Lelystad virus: Koch's postulates fulfilled. *Vet.Q.*, 13: 131-136.
- Teuffert, J.; Schlüter, H.; Müller, Th.; Ohlinger, V.F. (1995). Boar semen- a possible source of infection with PRRSV in breeding herds. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 57.
- Thacker, B. (1992). Serological surveys in a herd before, during and after an outbreak of SIRS. *Am. Assoc. Swine Pract. Newsl.*, 4: 40.
- Timoney, P.J.; McCollum, W.H.; Roberts, A.W.; Murphy, T.W. (1986). Demonstration of the carrier state in naturally acquired equine arteritis virus infection in the stallion. *Res. Vet. Sci.*, 41: 279-280.
- Torrison, J.; Vannier, P.; Albina, E.; Madec, F.; Morrison, R. (1994). Incidence and clinical effect of PRRS virus infection in gilts on commercial swine farms. In: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Tailandia. p. 511.
- Valencak, Z. (1996). Control of PRRS seropositivity in Slovenia. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 75.
- Valíček, L.; Psikal, I.; Smíd, B.; Rodak, L.; Kubalíková, R. (1996). Detection and epidemiology of PRRS in the Czech Republic. In: *Proc. 14th IPVS Congress*, Bolonia, Italia. p. 87.
- Varewyck, H. (1991). The epidemiology of PRRS in Belgium. In: *European Comm. Seminar on PRRS*, Bruselas, Bélgica. cap. 6.
- Vézina, S.A.; Loemba, H.; Fournier, M.; Dea, S.; Archambault, D. (1996). Antibody production and blastogenic response in pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome virus. *Can. J. Vet. Res.*, 60: 94-99.
- Vogel, K.; Kramer, M.; Teuffert, J.; Kramer, S. (1991). PRRS-epidemiological and economic analysis in Germany. In: *European Comm. Seminar on PRRS*, Bruselas, Bélgica. pp. 49-52.

Bibliografia

- Voicu, I.L.; Elazhary, Y.M.A.S.; Cornaglia, E. (1992). Porcine epidemic abortion and respiratory syndrome virus isolation in Québec. In: *73th Conf. Res. Work. Ani. Dis.*, p. 65.
- Voicu, I.L.; Silim, A.; Morin, M.; Elazhary, M.A.S.Y. (1994). Interaction of porcine reproductive and respiratory syndrome virus with swine monocytes. *Vet. Rec.*, 134: 422-423.
- Wang, Y.F.; Holstein, A.F. (1983). Intraepithelial lymphocytes and macrophages in the human epididymis. *Cell. Tiss. Res.*, 233: 517-521.
- Wrathall, A.E.; Mengeling, W.L. (1979). Effect of porcine parvovirus on development of fertilized pig eggs *in vitro*. *Br. Vet. J.*, 135: 249-254.
- Wensvoort, G. (1993). Lelystad virus and the porcine epidemic abortion and respiratory syndrome. *Vet. Res.*, 24: 117-124.
- Wensvoort, G. (1994). Porcine reproductive and respiratory syndrome. In: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Thailand. pp. 11-14.
- Wensvoort, G.; de Kluyver, E.P.; Luijtz, E.A.; den Besten, A.; Harris, L.; Collins, J.E.; Christianson, W.T.; Chladek, D. (1992). Antigenic comparison of Lelystad virus and swine infertility and respiratory syndrome (SIRS) virus. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4: 134-138.
- Wensvoort, G.; Terpstra, C.; Pol, J.M.A.; ter Laak, E.A.; Bloemraad, M.; de Kluyver, E.P.; Kragten, C.; van Buiten, L.; den Besten, A.; Wagenaar, F.; Broekhuijsen, J.M.; Moonen, P.L.J.M.; Zetstra, T.; de Boer, E.A.; Tibben, H.J.; de Jong, M.F.; van't Veld, P.; Groenland, G.J.R.; van Gennep, J.A.; Voets, M.Th.; Verheijden, J.H.M.; Braamskamp, J. (1991). Mystery swine disease in the Netherlands: the isolation of Lelystad virus. *Vet. Q.*, 13: 121-130.
- White, M.E.C. (1991). Front cover quiz (on PRRS). *In Practice*, 13: 215.
- White, M.E.C. (1992). The clinical signs and symptoms of "blue-eared pig disease" (PRRS). *Pig. Vet. J.*, 28: 62-68.
- White, M.E.C. (1995). Don't blame blue ear for all your lost production. *Pig Farming*, 43: 23-

Bibliografía

24.

-Wieczorek-Krohmer, M.; Weiland, F.; Conzelman, K.; Kohl, D.; Visser, N.; van Woensel, P.; Thiel, H.J.; Weiland, E. (1996). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV): monoclonal antibodies detect common epitopes on two viral proteins of european and US isolates. *Vet. Microbiol.*, 51: 257-266.

-Wills, R.W.; Fedorka-Cray, P.J.; Yoon, K.J.; Gray, J.T.; Stabel, T.; Zimmerman, J. (1997). Synergism between porcine reproductive and respiratory syndrome virus (PRRSV) and *Salmonella choleraesuis*. In: *Proc. 28th Ann. Meet. Am. Assoc. Swine Pract.*, Québec, Canadá. pp. 459-462.

-Wills, R.W.; Zimmerman, J.J.; Swenson, S.L.; Yoon, K.J.; Hill, H.T.; Bundy, D.S.; McGinley, M.J. (1994). Transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome virus: contact versus airborne routes. In: *Proc. NC Conf. Vet. Lab. Diagn.*, Manhattan, Kansas, USA, pp. 14-15.

-Wills, R.W.; Zimmerman, J.J.; Yoon, K.J.; Swenson, S.L.; McGinley, M.J.; Hill, H.T.; Platt, K.B. (1995a). Porcine reproductive and respiratory syndrome virus: isolation from chronically infected swine. In: *Proc. Am. Assoc. Swine Pract.*, pp. 387-389.

-Wills, R.W.; Zimmerman, J.J.; Yoon, K.J.; Swenson, S.L.; McGinley, M.J.; Hill, H.T.; Platt, K.B. (1995b). Portals of exit of porcine reproductive and respiratory syndrome virus. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 43.

-van Woensel, P.; van der Wouw, J.; Visser, N. (1994). Detection of porcine reproductive respiratory syndrome virus by the polymerase chain reaction. *J. Virol. Methods*, 47: 273-278.

-Yaeger, M.J.; Prieve, T.; Collins, J.; Christopher-Hennings, J.; Nelson, E.; Benfield, D. (1993). Evidence for the transmission of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus in boar semen. *Swine Health Prod.*, 1: 7-9.

-Yoon, I.J.; Joo, H.S.; Christianson, W.T.; Kim, H.S.; Collins, J.E.; Carlson, J.H.; Dee, S.A. (1992a). Isolation of a cytopathic virus from weak pigs on farms with a history of swine infertility and respiratory syndrome. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4: 139-143.

Bibliografía

- Yoon, I.J.; Joo, H.S.; Christianson, W.T.; Kim, H.S.; Collins, J.E.; Morrison, R.B.; Dial, G.D. (1992b). An indirect fluorescent antibody test for the detection of antibody to swine infertility and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 4: 144-147.
- Yoon, I.J.; Joo, H.S.; Christianson, W.T.; Morrison, R.B.; Dial, G.D. (1993). Persistent and contact infection in nursery pigs experimentally infected with porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus. *Swine Health Prod.*, 1: 5-8.
- Yoon, I.J.; Joo, H.S.; Goyal, S.M.; Molitor, T.W. (1994a). A modified serum neutralization test for the detection of antibody to porcine reproductive and respiratory syndrome virus in swine sera. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 6: 289-292.
- Yoon, K.J.; Henry, S.C.; Zimmerman, J.J.; Platt, K.B. (1996). Isolation of porcine cytomegalovirus from a swine herd with PRRS. *Vet. Med.*, agosto: 779-784.
- Yoon, K.J.; Zimmerman, J.J.; McGinley, M.J.; Landgraf, J.; Frey, M.L.; Hill, H.T.; Platt, K.B. (1995a). Failure to consider the antigenic diversity of porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus isolates may lead to misdiagnosis. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7: 386-387.
- Yoon, K.J.; Zimmerman, J.J.; McGinley, M.J.; Platt, K.B. (1995b). Variability in antibody dependent enhancement among PRRS virus isolates. In: *2nd Internl. Symp. on PRRS*, Copenhagen, Dinamarca. p. 45.
- Yoon, K.J.; Zimmerman, J.J.; Swenson, S.L.; McGinley, M.J.; Eernisse, K.A.; Brevik, A.; Rhinehart, L.L.; Frey, M.L.; Hill, H.T.; Platt, K.B. (1995c). Characterization of the humoral immune response to porcine reproductive and respiratory syndrome (PRRS) virus infection. *J. Vet. Diagn. Invest.*, 7: 305-312.
- Yoon, K.J.; Zimmerman, J.J.; Swenson, S.L.; Wills, R.W.; Hill, H.T.; Platt, K.B. (1994b). Assessment of the biological significance of antibody dependent enhancement (ADE) of porcine epidemic abortion and respiratory syndrome (PEARS) virus infection in passively immunized pigs. In: *Proc. 13th IPVS Congress*, Bangkok, Tailandia. p. 69.
- Zeman, D.; Neiger, R.; Yaeger, M.; Nelson, E.; Benfield, D.; Leslie-Steen, P.; Thomson, J.; Miskimins, D.; Daly, R.; Minehart, M. (1993). Laboratory investigation of PRRS virus infection